



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM QUÍMICA

DETERMINAÇÃO DE GLICERINA LIVRE E TOTAL EM BIODIESEL POR ELETROFORESE CAPILAR

Luiz Carlos Gonçalves Filho

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil
Fevereiro/2007

DETERMINAÇÃO DE GLICERINA LIVRE E TOTAL EM BIODIESEL POR ELETROFORESE CAPILAR

Luiz Carlos Gonçalves Filho

Relatório da disciplina Estágio Supervisionado QMC
5510 realizado no Laboratório de Eletroforese
Capilar da UFSC no 2º semestre de 2006.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke



Aos meus pais,
Luiz Carlos e Mazilda.

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal de Santa Catarina.
- Aos professores do departamento de Química da UFSC.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo A. Micke, pelo incentivo, dedicação, paciência e confiança neste trabalho.
- À empresa MIGROSBIO, pelo fornecimento de amostras.
- À empresa Quilab pelo fornecimento de alguns reagentes.
- Ao Sr. Leon Niclas (MIGROSBIO) pelas visitas técnicas e palestras disponibilizadas.
- À Ana Carolina pelas revisões e sugestões para melhoria do trabalho.
- Aos amigos que tornaram esta etapa da vida muito mais agradável.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
SIGLAS E ABREVIações	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 BIODIESEL	1
1.1.1 <i>Impacto Ambiental</i>	1
1.1.2 <i>Obtenção do Biodiesel</i>	3
1.1.3 <i>Controle de Qualidade do Biodiesel</i>	5
1.1.4 <i>Glicerina Livre e Glicerina Total</i>	5
1.2 ANÁLISE DE GLICERINA NO BIODIESEL	6
1.2.1 <i>Efeito da Glicerina no Biodiesel</i>	6
1.2.2 <i>Importância da Análise da Glicerina no Biodiesel</i>	6
1.2.3 <i>Métodos de Análise de Glicerina</i>	7
1.3 ELETROFORESE CAPILAR	8
1.3.1 <i>Instrumentação</i>	9
1.3.2 <i>Aspectos Gerais</i>	11
1.3.3 <i>Fluxo Eletrosmótico</i>	12
1.3.4 <i>Eletroferograma</i>	16
1.3.5 <i>Fenômenos de Eletrodispensão</i>	16
1.3.6 <i>Modos de Separação por Eletroforese Capilar</i>	18
1.3.6.1 <i>Eletroforese Capilar de Zona (ECZ)</i>	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
3.1 REAGENTES E AMOSTRAS	20
3.2 EQUIPAMENTOS	20
3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	21
3.3.1 <i>Glicerina Livre</i>	21
3.3.2 <i>Glicerina Total</i>	21

3.3.3 <i>Preparação da Amostra de Biodiesel para Estudo de Recuperação</i>	21
3.3.4 <i>Estudo da Recuperação da Glicerina Livre</i>	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. <i>DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO</i>	22
4.2. <i>AUMENTO DA VELOCIDADE DE SEPARAÇÃO</i>	26
4.3 <i>DISCUSSÃO</i>	26
4.3.1 <i>Reação entre Glicerina e Periodato</i>	28
4.4 <i>FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO</i>	29
4.5 <i>ANÁLISE DAS AMOSTRAS</i>	31
5 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Reação de Transesterificação	4
FIGURA 2: Fluxograma geral de obtenção de biodiesel utilizando metanol.	4
FIGURA 3: Clivagem oxidativa da glicerina pelo periodato.....	7
FIGURA 4: Reação seletiva de hidroxilas vicinais utilizando HIO_4	7
FIGURA 5: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.....	10
FIGURA 6: Esquema do fluxo eletrosmótico normal.	13
FIGURA 7: Representação geral da variação da mobilidade do fluxo eletrosmótico ($10^{-4} \text{ cm}^2 / \text{V.s}$) em função do pH do eletrólito de corrida.....	14
FIGURA 8: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico invertido - modelo das semi-micelas.	15
FIGURA 9: Representação esquemática dos modos de operação em eletroforese capilar. A) contra-eletrosmótico; B) co-eletrosmótico.	15
FIGURA 10: Exemplo de um eletroferograma para a separação de três componentes em fluxo normal.	16
FIGURA 11: Efeito da diferença de condutividade entre o analito e o eletrólito de corrida: A) analito apresenta uma condutividade maior que a condutividade do eletrólito; B) analito apresenta uma condutividade menor que a condutividade do eletrólito; C) analito apresenta uma condutividade equivalente a condutividade do eletrólito.....	17
FIGURA 12: Curvas de mobilidade efetiva vs. pH dos analitos de interesse.	23
LEGENDA: (▲nitrato; △ periodato; □ iodato; ◆ trifluoroacetato).	23
FIGURA 13: Curvas construídas utilizando o software Peakmaster®.....	25
FIGURA 14: Simulação Peakmaster®, Fluxo eletrosmótico obtido experimentalmente (A), Eletroferogramas de padrões (B) amostra (C) e (D) amostra sem adição de periodato e nitrato (seletividade). Eletrólito composto por 20 mmol L ⁻¹ glicina, 10 mmol L ⁻¹ TFA (pH 2,6). Condições: injeção hidrodinâmica (-50 mbar, 5 s), tensão aplicada 30 kV; 25 °C; detecção direta em 210 nm. 1) nitrato; 2) periodato; 3) iodato.....	27

FIGURA 15: Estudo do tempo de estabilidade do iodato formado após a oxidação da glicerina pelo periodato.....	28
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Limites de detecções típicos encontrados para diversos detectores	9
TABELA 2: Parâmetros de validação do método.	30
TABELA 3: Recuperação.	30
TABELA 4: Análise de glicerina livre e total em amostras de biodiesel.....	31

SIGLAS E ABREVIACÕES

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM – American Society for Testing and Materials

EN ISO – International Organization for Standardization

ECZ – Eletroforese Capilar de Zona

EMD – Dispersão por eletromigração

S_x – Velocidade de slope.

μ_{abs} – Mobilidade absoluta

μ_{ef} – Mobilidade efetiva

α_j – Fração molar

S/R – Razão sinal ruído

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIODIESEL

A geração de energia sempre foi motivo de preocupação nos diversos segmentos industriais. Os insumos potencialmente capazes de promover o abastecimento da demanda de geração energética têm originado diversas pesquisas científicas com o objetivo de amenizar os impactos ambientais ocasionados por sua combustão.

No Brasil, segundo dados do Ministério de Minas e Energia, foram consumidos em 1999 cerca de 37,5 bilhões de litros de diesel, dos quais 5,3 bilhões de litros necessitaram serem importados, fato que chamou a atenção do governo em procurar um combustível que pudesse concorrer com o diesel mineral. Nesse panorama surge o biodiesel como opção ¹.

Não há como questionar que o Brasil será em breve o celeiro dos biocombustíveis, sabendo que o Brasil é o maior exportador de soja, algodão, cana de açúcar, carne bovina, suína e aves. Estudos divulgados pelo “National Biodiesel Board” (EUA), órgão responsável pela implementação do biodiesel nos Estados Unidos, afirma categoricamente que o Brasil tem condições de liderar a produção mundial de biodiesel, promovendo a substituição de, pelo menos, 60% da demanda mundial atual de óleo diesel mineral ².

O biodiesel em comparação ao diesel de petróleo oferece um grande benefício ambiental por apresentar um perfil baixo de emissão de poluentes e ser biodegradável². O biodiesel foi definido pela “National Biodiesel Board” (EUA) como derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores de ciclo diesel) ³.

1.1.1 *Impacto Ambiental*

Uma das vantagens associada à utilização de combustíveis renováveis, ou biocombustíveis, está relacionada com a redução nas emissões de gases nocivos para o ambiente. O uso continuado e crescente de petróleo intensifica a poluição atmosférica aumentando ainda mais o problema atual do efeito estufa causado

pela liberação de CO_2 . Na medida em que se utilizam combustíveis renováveis deve-se avaliar a quantidade de gases emitida e deduzi-la do volume capturado na fotossíntese da biomassa que lhe serve de matéria-prima. Assim, chegando a uma diminuição de CO_2 no balanço de massas final comparando os combustíveis fósseis com os biocombustíveis, evidenciando uma diminuição na poluição ^{4,5,6,7,8}.

A reação básica para a produção de biodiesel envolve a utilização de um óleo de origem vegetal ou animal e um álcool, a qual é acelerada por um catalisador. Quando o álcool for de origem vegetal (álcool etílico), a emissão de CO_2 decorrente da combustão do biodiesel é reabsorvida na íntegra pela fotossíntese durante as próximas safras das biomassas das quais se produz o álcool e o óleo. Entretanto, quando o álcool utilizado for de origem mineral (metanol) apenas a fração de CO_2 proveniente da combustão do biodiesel referente à queima do óleo vegetal (no mínimo 78%) será reabsorvida ⁸.

Estudos comprovam que a redução de 78% dos gases do efeito estufa decorrente da utilização de biomassa juntamente com 22% de metanol fóssil, apresentam uma redução de 50% nas emissões de material particulado e 98% nas emissões de enxofre. Apenas os óxidos nitrogenados (NO_x), causadores de doenças nas vias respiratórias tem aumento na faixa de 13% ⁹.

O diesel mineral possui quantidades significativas de enxofre sob a forma de mercaptanas, substâncias extremamente nocivas ao meio ambiente local e ao homem. As mercaptanas compõem as emissões provenientes da descarga dos motores diesel, especialmente quando funcionam fora da faixa normal (partidas e desacelerações), e em quantidades excessivas quando os sistemas não estão ajustados ou regulados.

A queima do biodiesel juntamente com o diesel mineral favorece a oxidação das mercaptanas transformando-as em dióxido de enxofre, mais volátil e menos danoso aos seres vivos ⁸.

O biodiesel apresenta algumas características importantes que são apresentadas a seguir ^{10,11}:

- I. É livre de enxofre e compostos aromáticos, apresenta alto número de cetanos, ponto de combustão apropriado, excelente lubricidade, não tóxico e biodegradável;

- II. Reduz sensivelmente as emissões de partículas de carbono (fumaça), monóxido de carbono, óxidos sulfúricos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos;
- III. Complementa todas as novas tecnologias do diesel, com desempenho similar e sem exigência da instalação de uma infraestrutura ou política de treinamento específico;
- IV. O gás carbônico liberado na queima é absorvido pelas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera;
- V. Permite a valorização de sub-produtos de atividades agro-industriais, aumento na arrecadação regional, aumento da fixação do homem no campo e de investimentos complementares em atividades rurais;
- VI. Pequenas e médias plantas para produção de biodiesel podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria disponível em cada local.

1.1.2 Obtenção do Biodiesel

Óleos vegetais ou animais, além dos triglicerídeos, geralmente apresentam ácidos graxos livres, fosfolipídios, água e outras impurezas. Suas características físico-químicas os impedem de serem utilizados diretamente como combustível. Para superar estes problemas o óleo requer uma modificação química gerada por reações de esterificação, transesterificação ou craqueamento. Entre estas, atualmente a mais utilizada em larga escala é a transesterificação.

Transesterificação é a reação de um lipídeo com um álcool, gerando um éster e um sub-produto, a glicerina. Este processo é similar à hidrólise, exceto pela utilização de um álcool anidro (na transesterificação) no lugar da água ¹². O processo global de transesterificação de óleos vegetais e gorduras é uma seqüência de três reações reversíveis e consecutivas em que os monoglicerídeos e os diglicerídeos são os intermediários, nesta reação são necessários 3 moles de álcool para cada mol de triglicerídeo. Na prática é sempre utilizado um excesso de álcool de modo a aumentar o rendimento dos ésteres (deslocar a reação para o lado dos produtos) e permitir a separação da glicerina formada, como visto na figura 1.

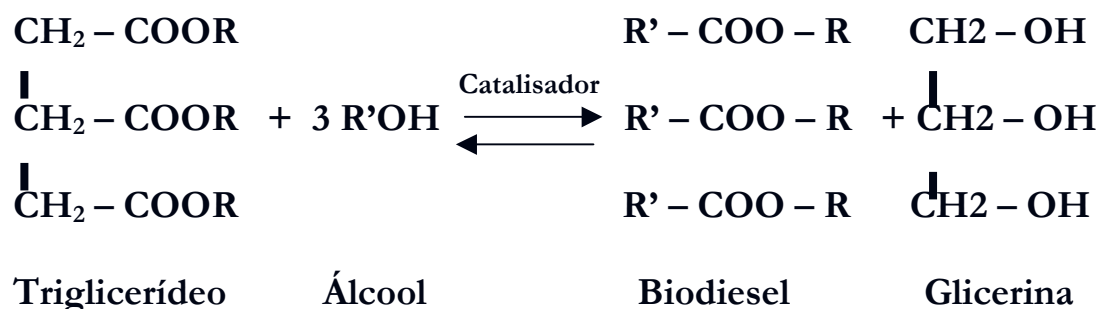


Figura 1: Reação de Transesterificação

Do ponto de vista cinético, a transesterificação pode ser conduzida em processos catalisados por ácidos, enzimas ou bases fortes. A catálise básica é a mais utilizada na produção industrial de biodiesel.

A transesterificação apresenta etapas fundamentais: i) a de mistura do catalisador com o álcool a ser utilizado na reação; ii) a reação do álcool/catalisador com o óleo; iii) a separação dos produtos formados que são os ésteres e a glicerina por decantação; iv) e a purificação dos produtos obtidos durante a separação de fases. A purificação pode incluir uma lavagem do biodiesel com água para a extração de glicerina, álcool, catalisador entre outros produtos indesejados que possam ter se formado durante a reação. A Figura 2 mostra um esquema geral destas etapas.

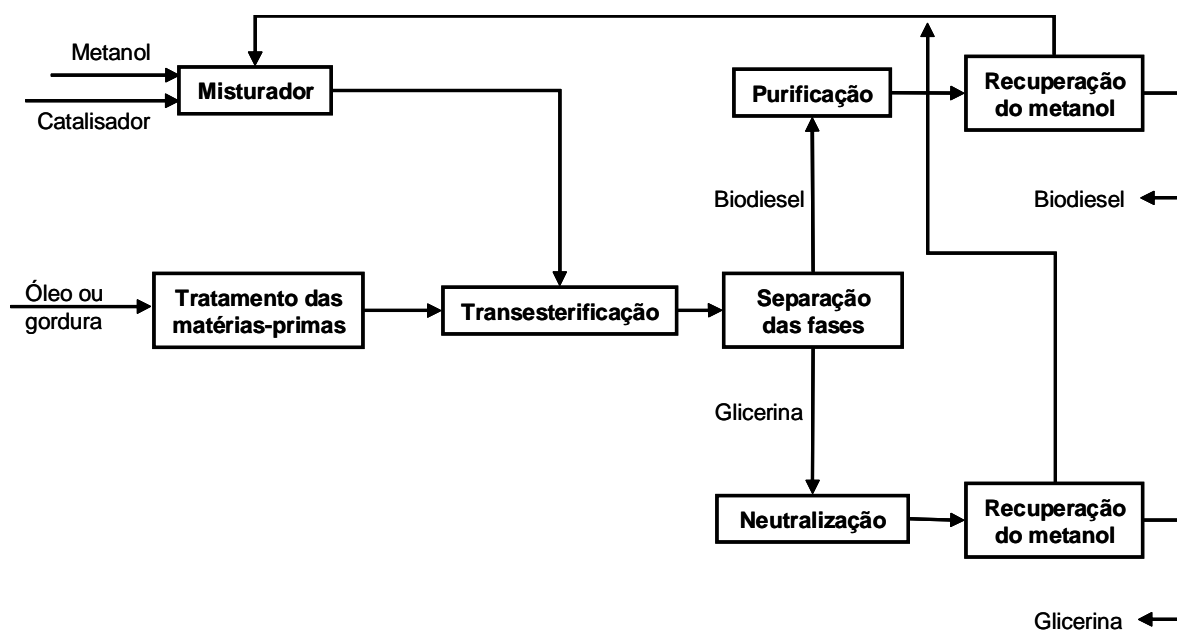


Figura 2: Fluxograma geral de obtenção de biodiesel utilizando metanol.

1.1.3 Controle de Qualidade do Biodiesel

Todo o biodiesel produzido no Brasil deve apresentar um certificado de qualidade para que a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) autorize a sua comercialização. Os métodos aceitos pela ANP seguem normas ABNT NBR (Associação Brasileira de Normas Técnicas), ASTM ("American Society for Testing and Materials") e EN ISO ("International Organization for Standardization") para determinação dos parâmetros físico-químicos que torna o biodiesel aceitável como combustível¹³. (Anexo I RESOLUÇÃO ANP Nº 42, DE 24.11.2004).

A qualidade do biodiesel pode ser influenciada por contaminantes que tem sua origem na produção ou de outras fontes. A natureza do óleo utilizada na reação é que determina as propriedades do biodiesel. Entretanto, o biodiesel é um derivado de ácidos graxos, mas as propriedades do combustível não são dependentes apenas da estrutura do ácido graxo de origem, mas sim da estrutura do éster formado após a reação com o álcool.

As propriedades analisadas do biodiesel como combustível incluem: número de cetano; viscosidade cinemática; ponto de fulgor; teor de éster; índice de acidez; monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, glicerina livre e total entre outros¹⁴.

1.1.4 Glicerina Livre e Glicerina Total

A glicerina pode estar livre ou ligada ainda a ácidos graxos na forma de monoglicerídeos, diglicerídeos ou triglicerídeos. Na determinação da glicerina livre ocorre a quantificação da massa de glicerina que não está ligada a nenhum ácido graxo e se apresenta na forma de glicerol e a quantificação da glicerina total é a soma da massa de glicerina livre mais a massa da glicerina que está ligada aos ácidos graxos na forma de monoglicerídeos, diglicerídeos ou triglicerídeos.

A realização desta análise segue as normas ASTM D 6584 e EN ISO 14105, utilizando o método de cromatografia a gás, e determina que a massa de glicerina livre presente na amostra não deve exceder 0,020% e de glicerina total não ultrapasse 0,38% da massa da amostra ¹⁵.

1.2 ANÁLISE DE GLICERINA NO BIODIESEL

1.2.1 Efeito da Glicerina no Biodiesel

A glicerina livre, produto proveniente da reação de transesterificação, é muito pouco solúvel no biodiesel e pode estar presente em pequenas quantidades como consequência de um processo pouco efetivo de separação de fases na produção, ou uma purificação pouco eficiente após a separação.

Estudos indicam que a solubilidade da glicerina livre no biodiesel está na faixa de 0,144% a 0,187% ¹⁶, entretanto o nível de glicerina livre permitido pela especificação da ANP é de apenas 0,02%. Este nível encontra-se bem abaixo da solubilidade da glicerina neste meio, porém pode ser alcançado através da lavagem do biodiesel com água ou outros métodos de purificação existentes como a utilização de adsorventes ¹⁶.

A glicerina livre no combustível pode se depositar nas câmaras do motor e filtros prejudicando seu desempenho e causando danos. Apresentando uma solubilidade baixa em ésteres metílicos ou etílicos, a glicerina livre tende a se depositar com o tempo no fundo dos tanques de armazenamento de combustível. Além disso, por apresentar uma afinidade elevada com monoglicerídeos residuais da reação e com a água que entra principalmente nos tanques pela umidade do ar, a tendência é ocorrer uma concentração destes contaminantes indesejados. A presença de água em um produto biodegradável como o biodiesel é um fator de risco já que este contaminante favorece o crescimento microbiano na forma de fungos e bactérias acelerando o processo de degradação do biodiesel. Estes microorganismos produzem uma espécie de lama que pode causar o entupimento dos filtros. A glicerina ligada quando está acima do limite ideal para o biodiesel (0,38% em massa) provoca o entupimento dos bicos injetores do motor, depósitos na câmara do motor, entupimento dos filtros e alteração das características físico-química do próprio biodiesel¹⁶.

1.2.2 Importância da Análise da Glicerina no Biodiesel

Sendo a glicerina um contaminante para o biodiesel e seu excesso causador de prejuízos e estragos nos motores e tanques de armazenamento, é evidente que a análise e o controle deste parâmetro tornam-se essenciais para impossibilitar a comercialização e o consumo de um combustível inadequado.

Esta análise também pode ser utilizada como uma ferramenta para determinação do rendimento da reação de transterificação do óleo, já que a glicerina total é proveniente dos monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos que não reagiram completamente mais a quantidade de glicerina livre proveniente de uma purificação incompleta.

1.2.3 Métodos de Análise de Glicerina

Na literatura são apresentadas algumas técnicas analíticas capazes de determinar glicerina livre em biodiesel tais como Cromatografia Gasosa ¹⁷, espectrofotometria UV-Vis ¹⁸, e cromatografia de exclusão ¹⁹, assim como métodos enzimáticos ²⁰.

Sendo a glicerina um poliálcool, este pode reagir com periodato sofrendo uma clivagem oxidativa, de acordo com a reação apresentada na Figura 3.

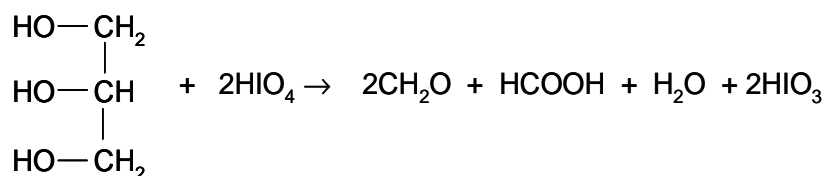


Figura 3: Clivagem oxidativa da glicerina pelo periodato.

A clivagem oxidativa da glicerina pelo periodato produz duas moléculas de formaldeído, uma molécula do ácido fórmico e duas moléculas de iodato. Uma medida do iodato formado pela reação do periodato com a glicerina permite a determinação da concentração de glicerina na amostra. A reação do periodato na glicerina é seletiva e ocorre em hidroxilas vicinais, como ilustrado na Figura 4.

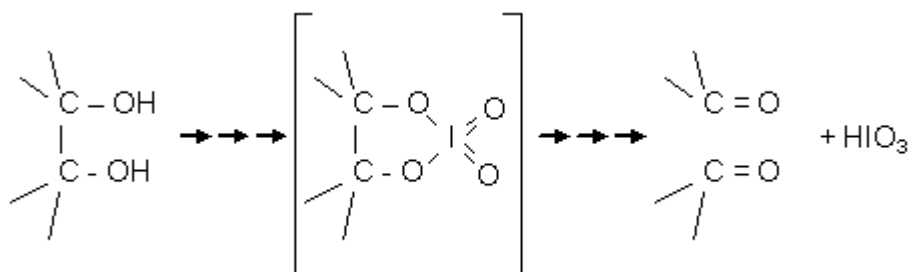


Figura 4: Reação seletiva de hidroxilas vicinais utilizando HIO_4

Na literatura são apresentados alguns trabalhos que utilizam a eletroforese capilar na determinação da concentração de compostos contendo hidroxilas

vicinais utilizando a reação com o periodato ^{21,22}, sendo realizada com base no iodato formado.

A reação com periodato também é utilizada para determinação de glicerina por espectrofotometria UV-Vis ¹⁸, porém o formaldeído é analisado através de uma reação colorimétrica com acetilacetona.

1.3 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração de espécies iônicas ou ionizáveis quando estas são submetidas a um campo elétrico. Ela foi inicialmente introduzida pelo químico Arne Tiselius que obteve o título de Ph.D., em 1930, com sua Tese "The Moving Boundary Method for Studying the Electrophoresis of Proteins" (Estudo da separação eletroforética de proteínas pelo método da fronteira móvel). Tiselius desenvolveu métodos para a separação e análise de substâncias como albumina, vírus, soro sanguíneo e hormônios. Arne Tiselius manteve-se como professor de bioquímica em Uppsala de 1938 até 1968, e em 1948 recebeu o Prêmio Nobel de Química ^{23,24}.

Um modo de aplicação da técnica de separação desenvolvida por Tiselius é a eletroforese capilar. A eletroforese capilar é uma técnica relativamente nova, idealizada primeiramente por Hjertén ²⁵ em 1967, tendo os primeiros trabalhos publicados na década de 70. Entretanto, a primeira análise desenvolvida com sucesso foi publicada por Everaerts e seus colaboradores em 1979 ²⁶, seguida de Jorgenson e Lukacs em 1981 ²⁷.

Simplificando, a eletroforese capilar é a utilização da técnica original descrita por Tiselius, porém com o emprego de um tubo capilar, preenchido com um eletrólito conforme o próprio nome sugere ²⁸.

A eletroforese capilar vem sendo utilizada nas mais diversas áreas como química ²⁹, bioquímica³⁰, ciência forense ³¹, laboratórios clínicos ³², indústrias farmacêuticas ³³ etc. A importância e aceitação desta potente ferramenta analítica tem atraído atenção não apenas pela sua simplicidade instrumental e características de desempenho, mas principalmente pela grande variedade de modos de separação que podem ser aplicados utilizando um único tipo de capilar ³⁴.

Os diferentes mecanismos de separação favorecem sua aplicação em um vasto campo variando desde moléculas pequenas até moléculas de milhares de Daltons ^{35,36,37}.

Uma das grandes versatilidades desta técnica é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores, que são basicamente uma adaptação daqueles utilizados nos equipamentos de cromatografia em meio líquido para o formato capilar. Tais detectores podem ser de absorção no UV-vis³⁸, fluorescência ³⁹, fluorescência induzida por laser ⁴⁰, espectrometria de massas ⁴¹, condutividade ⁴², amperometria ⁴³, radioatividade ⁴⁴, índice de refração e Raman ⁴⁵.

A escolha do detector depende quase que exclusivamente das propriedades do soluto em questão e da faixa de concentração contemplada. A Tabela 1 mostra os limites de detecção típicos encontrados para diversos detectores ⁴⁵.

Tabela 1: Limites de detecções típicos encontrados para diversos detectores

Detector	LD (mol.L ⁻¹)
Absorção no UV-vis *	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁸
Fluorescência direta (lâmpada) *	10 ⁻⁷ – 10 ⁻⁹
Fluorescência induzida por laser *	10 ⁻¹⁴ – 10 ⁻¹⁶
Amperometria	10 ⁻⁸ – 10 ⁻⁹
Raman	10 ⁻⁶ – 10 ⁻⁷
Espectrometria de massas *	10 ⁻⁴ – 10 ⁻⁹
Índice de refração	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶
Condutividade	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶

*Disponíveis comercialmente

1.3.1 Instrumentação

A instrumentação requerida para a eletroforese capilar é ilustrada na Figura 5.

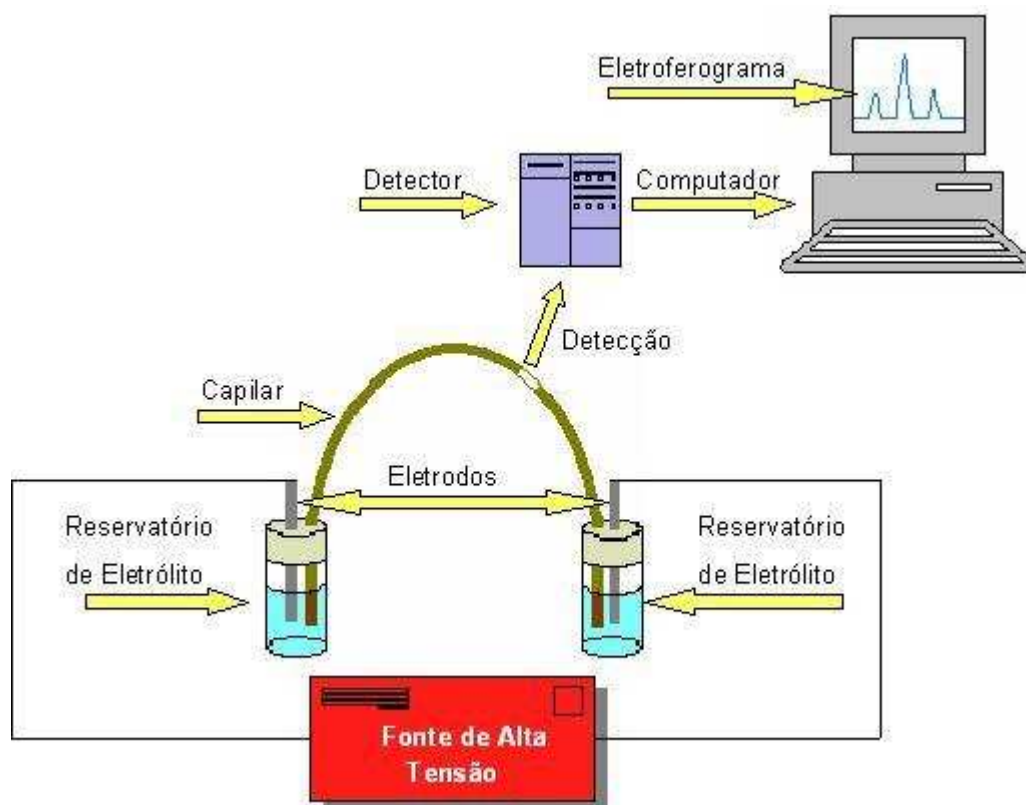


Figura 5: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

Os equipamentos de eletroforese capilar apresentam características básicas como uma fonte de alta tensão, um módulo de detecção, o capilar (normalmente de sílica fundida), os eletrodos (normalmente de platina) e um computador para aquisição e tratamento de dados.

A separação das espécies em eletroforese capilar é efetuada em tubos com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno com 30 a 150 cm de comprimento, suas extremidades são inseridas em reservatórios separados e estes são preenchidos com o eletrólito de corrida. Em cada um destes reservatórios são posicionados eletrodos conectados a uma fonte de alta tensão capaz de aplicar até 30 kV. O analito é injetado no capilar por alguns instantes pela substituição de um dos reservatórios dos eletrólitos (normalmente no ânodo) pelo reservatório do analito. A injeção pode ser hidrodinâmica quando uma alíquota do analito é introduzida no capilar através da aplicação de uma pressão determinada por um breve período de tempo no recipiente do analito ocorrendo a transferência deste para o capilar. A injeção do analito no capilar também pode ser eletrocinética, quando é aplicada uma diferença de potencial por alguns segundos no reservatório onde encontra-se o analito. Após a injeção do analito,

o reservatório de eletrólito retorna a extremidade do capilar, uma diferença de potencial é aplicada através do capilar e a separação é então iniciada. A detecção óptica dos analitos separados pode ser alcançada diretamente através da parede do capilar, normalmente próximo à extremidade oposta (cátodo).

1.3.2 Aspectos Gerais

A execução da técnica em capilares permite a aplicação de campos elétricos muito elevados (100 a 1000 V/cm) pela grande eficiência da dissipação do calor gerado pelo campo elétrico através do meio condutor (efeito Joule) devido aos efeitos geométricos do capilar que apresentam uma relação entre a área superficial interna e volume apreciavelmente grande.

O estabelecimento de campos elétricos elevados favorecidos pela alta resistência elétrica do capilar resulta em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos), resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos. Outras vantagens da eletroforese capilar são: a demanda de amostra é pequena, com volumes tipicamente da ordem de 1 a 50 nL e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo³⁴.

Como mencionado anteriormente, a eletroforese é o movimento, ou migração dos íons sob influência de um campo elétrico. Conseqüentemente, a separação é baseada nas diferenças de velocidade de migração destes íons. A velocidade de migração do íon pode ser expressa como: (Equação 1)

$$V = \mu_e \cdot E \quad (1)$$

onde V é a velocidade de migração do íon (cm.s^{-1}), μ_e é a mobilidade eletroforética do íon ($\text{cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$) e E é a força do campo elétrico aplicado no capilar (V.cm^{-1}).

A força do campo elétrico é uma função da tensão aplicada dividida pelo comprimento total do capilar. A mobilidade eletroforética (μ_e) é um fator que indica a rapidez com que um íon pode se mover em um determinado meio (tal como uma solução de eletrólito) em um dado campo elétrico. A Equação 2 descreve a mobilidade eletroforética.

$$\mu_e = q / 6.\pi.\eta.r \quad (2)$$

Onde q é a carga do íon, η é a viscosidade da solução e r é o raio do íon em solução. A carga do íon (q) é fixa para íons inteiramente dissociados tais como ácidos fortes, mas pode ser afetado por mudanças de pH no caso de ácidos ou bases fracas. O raio do íon (r) pode ser afetado pela presença de um contra-íon ou pela presença de agentes complexantes. Da Equação 2 pode-se observar que diferenças na mobilidade eletroforética são causadas por diferenças no raio e carga dos íons do analito ⁴⁶.

1.3.3 Fluxo Eletrosmótico

É o fenômeno que ocorre no interior do capilar de sílica fundida, onde em sua superfície estão dispostos grupamentos silanol (SiOH) que apresentam um caráter ácido. No momento que uma solução com pH acima de 3 é injetada, ocorre uma interação entre a solução e os grupos silanol do capilar e estes tornam-se ionizados, os íons H^+ migram para o seio da solução e a superfície do capilar adquire carga negativa ⁴⁷. Capilares de teflon ou pirex também exibem este fenômeno.

No momento em que o campo elétrico é aplicado, as forças elétricas causam um movimento dos íons H^+ hidratados em direção ao eletrodo de carga oposta e este movimento de migração faz com que moléculas de água sejam transportadas, induzindo um fluxo de solução como um todo na direção do cátodo caracterizando assim o fluxo eletrosmótico. Este fluxo é o responsável pela condução dos analitos sem distinção de cargas até o detector, possibilitando assim a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos. Este movimento de migração das moléculas quando ocorre do pólo positivo para o pólo negativo é denominado fluxo eletrosmótico normal e é representado pela Figura 6 ^{29,48}.

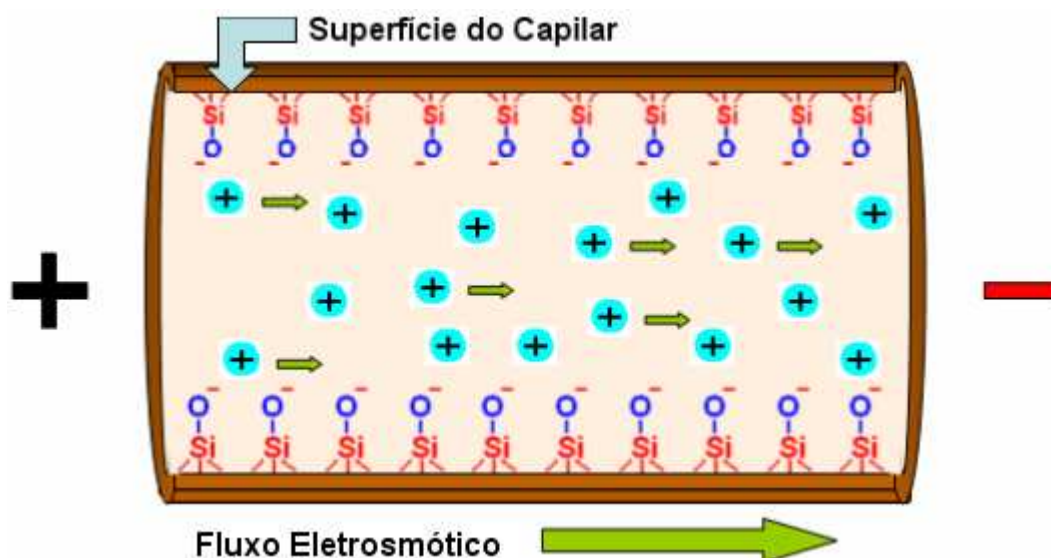


Figura 6: Esquema do fluxo eletrosmótico normal.

Para otimizar as separações dos analitos é possível controlar a velocidade do fluxo eletrosmótico modificando o pH do eletrólito de corrida. Quando em pH elevado o fluxo adquire uma mobilidade alta, reduzindo assim o tempo de análise. Em determinadas circunstâncias o fluxo pode ser reduzido ou invertido, isso varia de acordo com a necessidade de cada separação. A velocidade do fluxo eletrosmótico pode também ser controlado através da variação da viscosidade, variação de temperatura, força do campo elétrico aplicado, adição de solventes orgânicos, entre outros⁴⁶. A Figura 7 ilustra de uma maneira geral a variação do fluxo eletrosmótico em função da variação do pH.

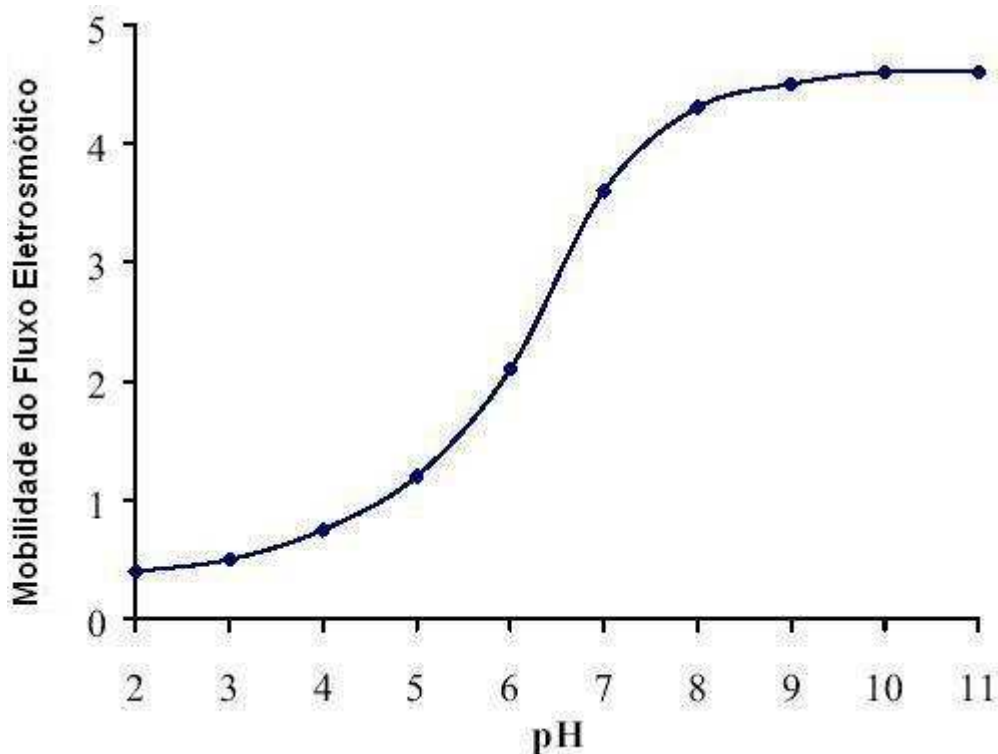


Figura 7: Representação geral da variação da mobilidade do fluxo eletrosmótico ($10^{-4} \text{ cm}^2 / \text{V.s}$) em função do pH do eletrólito de corrida.

Em muitos casos o fluxo eletrosmótico é invertido utilizando tensoativos catiônicos como derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ao eletrólito condutor. Assim, uma camada de semi-micelas é adsorvida à superfície do capilar formando na solução uma camada de aniões. Agora, quando aplicada a diferença de potencial o fluxo migrará em direção ao ânodo, sendo considerado fluxo eletrosmótico invertido, como mostrado na Figura 8.

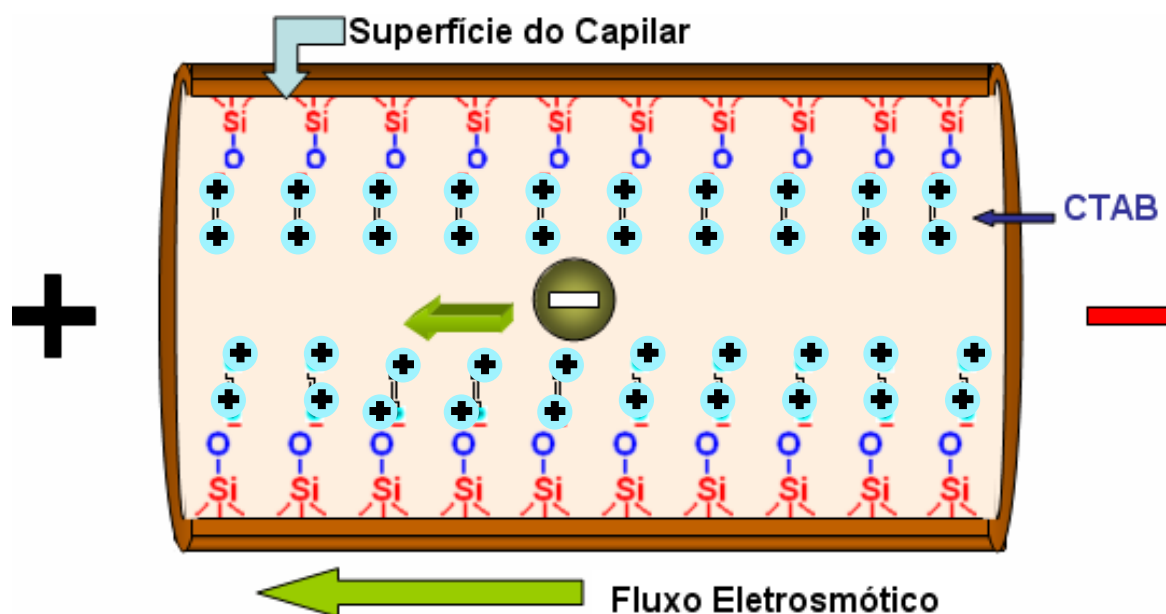


Figura 8: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico invertido - modelo das semi-micelas.

As análises em eletroforese capilar podem ser realizadas com a detecção dos analitos migrando na mesma direção do fluxo eletrosmótico, este modo é chamado de co-eletrosmótico, ou ainda com os analitos migrando em sentido oposto ao fluxo, este modo é chamado de contra-eletrosmótico (Figura 9).

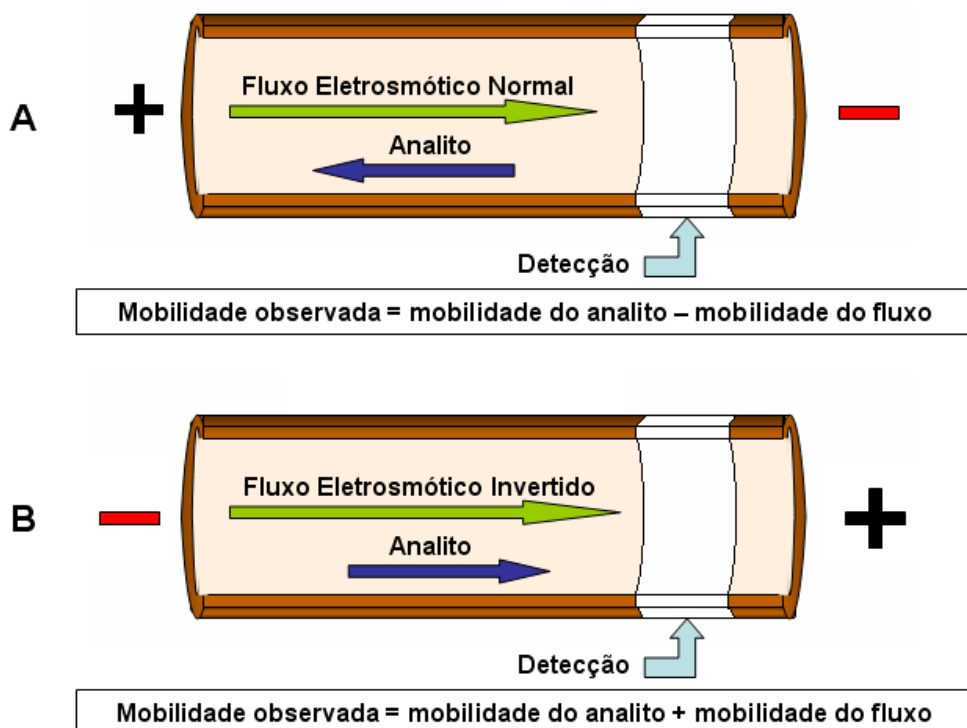


Figura 9: Representação esquemática dos modos de operação em eletroforese capilar. A) contra-eletrosmótico; B) co-eletrosmótico.

1.3.4 Eletroferograma

Os dados de saída de uma análise por eletroforese capilar são denominados eletroferogramas, análogo a um cromatograma. Em um eletroferograma é *plotado* o tempo de migração do analito *versus* o sinal do detector. A intensidade do sinal do detector, ou resposta, é dependente da concentração do analito. Um típico eletroferograma utilizando-se fluxo eletrosmótico normal é mostrado na Figura 10 para a separação de três componentes, uma mistura de solutos catiônicos, neutros e aniônicos ⁴⁶.

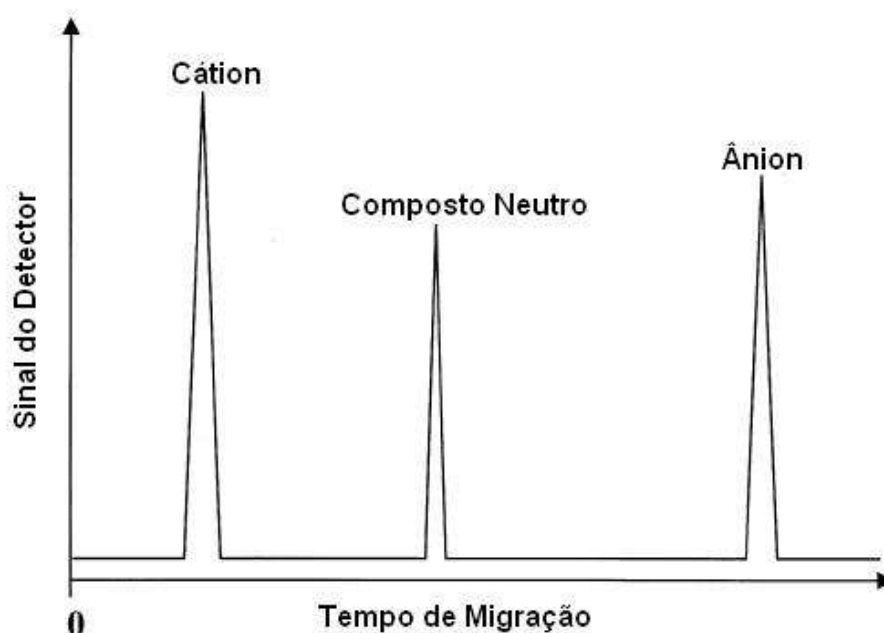


Figura 10: Exemplo de um eletroferograma para a separação de três componentes em fluxo normal.

1.3.5 Fenômenos de Eletrodispersão

Os fenômenos eletrodispersivos podem afetar a resolução da separação dos componentes de uma mistura que está sendo analisada, resultando em picos gerados no eletroferograma não simétricos e uma redução no número de pratos da separação. Outros fatores que também contribuem para o alargamento das bandas são a difusão longitudinal e os volumes finitos de injeção e detecção ⁴⁹.

Para eletrólitos fortes a eletrodispersão ocorre devido a diferença entre as condutividades do analito e do eletrólito de corrida. Este fenômeno é ilustrado na Figura 11. ³⁴

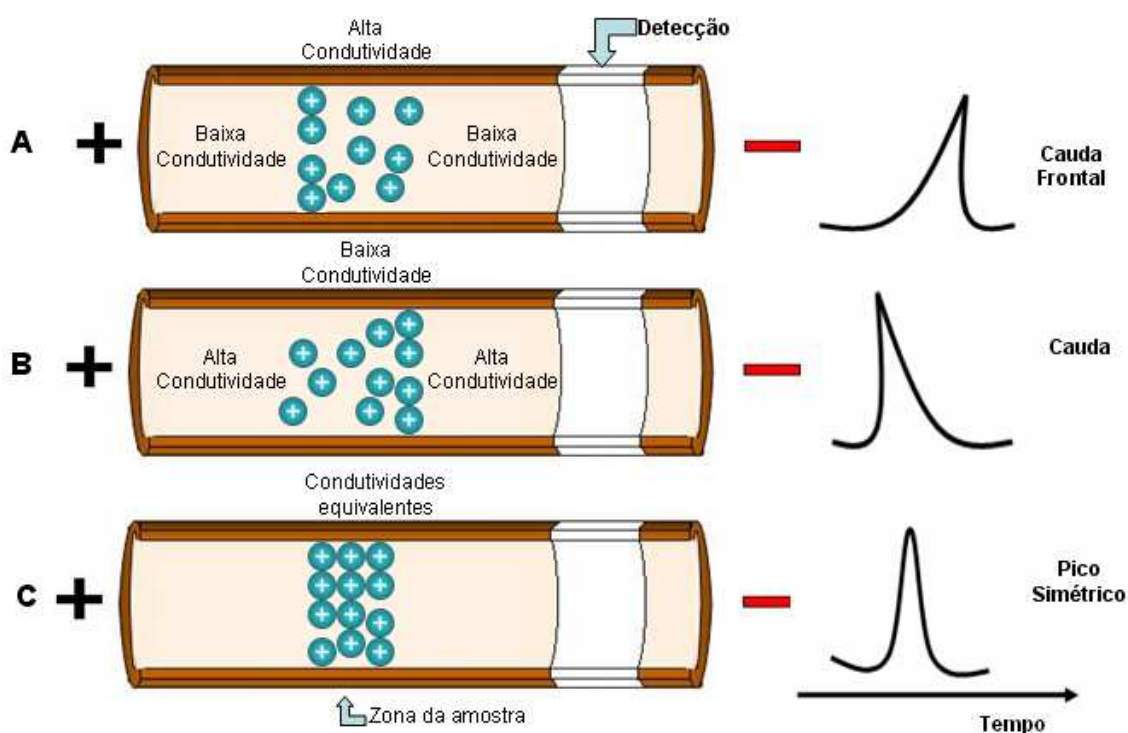


Figura 11: Efeito da diferença de condutividade entre o analito e o eletrólito de corrida: A) analito apresenta uma condutividade maior que a condutividade do eletrólito; B) analito apresenta uma condutividade menor que a condutividade do eletrólito; C) analito apresenta uma condutividade equivalente a condutividade do eletrólito.

Os analitos no interior do capilar tendem a se dispersar devido a uma difusão longitudinal. Os íons mais distantes do centro da zona da amostra estão em uma região onde a condutividade predominante é a do eletrólito de corrida, enquanto que os íons que se encontram mais ao centro da banda encontram-se numa região em que a condutividade predominante é a do próprio analito.

Quando o campo elétrico é aplicado, três situações podem ocorrer devido a diferença da condutividade entre os analitos e o eletrólito de corrida como descrito na Figura 11.

Na Figura 11A o eletrólito apresenta uma condutividade menor que a do analito. No momento da aplicação do campo elétrico os íons mais distantes do centro da banda são submetidos a um campo elétrico maior que o campo elétrico do centro, com isso os íons que estão à frente são acelerados e se distanciam rapidamente da zona da amostra, ocasionando uma cauda frontal.

A Figura 11B representa uma situação em que a condutividade do eletrólito é maior que a condutividade do analito, fazendo com que no momento da aplicação do campo elétrico os íons mais distantes do centro da amostra

sejam submetidos a um campo elétrico menor resultando em uma velocidade eletroforética menor, assim os íons que estão à frente serão alcançados, e os que estão atrás da banda são atrasados formando a chamada cauda.

Na Figura 11C é apresentada uma situação ideal em que a condutividade do eletrólito de corrida e do analito são equivalentes e com isso o campo elétrico no interior do capilar é constante e os picos gerados são simétricos.³⁴

1.3.6 Modos de Separação por Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar apresenta 6 modos distintos de operação, dentre eles eletroforese capilar em gel; focalização isoeletrica capilar; eletrocromatografia capilar micelar; isotacoforese; eletrocromatografia capilar e eletroforese capilar em zona. Neste trabalho será abordado apenas eletroforese capilar em zona.

1.3.6.1 Eletroforese Capilar de Zona (ECZ)

A separação em ECZ é baseada nas diferenças de mobilidades eletroforéticas resultantes das diferentes velocidades de migrações de espécies iônicas no eletrólito, contido dentro do capilar.

O mecanismo de separação é baseado nas diferenças de razão massa/carga dos solutos em um dado valor de pH. Na ECZ espécies neutras não são separadas, porém é permitida a separação de cátions e ânions na mesma corrida⁵⁰. Análises em valores de pH menor que 3 podem ser executadas no modo co-eletrosmótico para cátions e no modo contra-eletrosmótico para ânions. Em pH ao redor de 7, compostos aniônicos serão analisados no modo contra-eletrosmótico com fluxo normal, ou ainda no modo co-eletrosmótico com o fluxo invertido. E finalmente, para valores acima de pH 9, os cátions serão analisados no modo co-eletrosmótico e ânions no modo contra-eletrosmótico na presença de fluxo normal⁵¹.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Este trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento de um método alternativo e rápido para a determinação de glicerina livre e total em amostras de biodiesel utilizando eletroforese capilar (EC) como técnica analítica mediante reação de glicerina com periodato.

2.2 *Objetivos Específicos*

- I. Estudar a extração líquido-líquido de glicerina em amostras de biodiesel;
- II. Estudar a reação de saponificação dos glicerídeos (mono, di ou tri) para a formação de glicerina como sub-produto;
- III. Estudar a reação entre periodato e glicerina (clivagem oxidativa de hidroxilas vicinais):
 - a. determinar o tempo de reação;
 - b. determinar a estabilidade dos produtos;
- IV. Utilizar “softwares” de simulação e otimização para o desenvolvimento do método:
 - a. determinar os componentes do eletrólito de corrida;
 - b. escolher o padrão interno;
 - c. determinar o modo de operação;
- V. Validar o método desenvolvido.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Amostras

Todos os reagentes utilizados na preparação do eletrólito são reagentes analíticos. Clorofórmio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, glicina e nitrato de sódio são da marca Merck (Darmstadt, Germany). Ácido trifluoracético de marca Fluka. Água desionizada (deionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, USA) foi utilizada para o preparo das soluções.

Soluções padrão estoque (1000 mg L^{-1}) de periodato, glicerina e nitrato de sódio foram preparadas com água armazenada a 4°C . As soluções padrão de trabalho eram preparadas diariamente a partir da diluição com água das soluções estoque.

Soluções estoque (100 mmol L^{-1}) de ácido trifluoracético (TFA) e Glicina foram usadas para a preparação dos eletrólitos de corrida.

O eletrólito de corrida utilizado constituiu-se de Glicina 20 mmol L^{-1} e TFA 10 mmol L^{-1} , pH 2.6.

Foram utilizadas amostras de biodiesel de soja, mamona e gordura animal fornecidas por empresas locais. Também foi preparada uma amostra de biodiesel de soja para o estudo de recuperação.

3.2 Equipamentos

As análises foram efetuadas em um equipamento de Eletroforese Capilar da marca Agilent Technologies modelo HP^{3D}CE (Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas foram executadas a 25°C em capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato ($32\text{cm} \times 75 \mu\text{m}$ D.I. $\times 375 \mu\text{m}$ D.E.) proveniente da empresa Microtube (Araraquara, Brasil). Antes da primeira utilização do capilar ele deve ser condicionado a 25°C da seguinte forma: 30 minutos com uma solução de NaOH 1 mol L^{-1} , 30 minutos com água e 20 minutos com o eletrólito de corrida a ser utilizado na análise. O condicionamento entre as corridas foi de 0,6 minutos com o eletrólito de corrida. Ao final de cada sessão de análise é necessário lavar o capilar por 10 minutos com água deionizada. As soluções padrão e as amostras são introduzidas pelo *outlet* (saída do capilar) e a injeção é hidrodinâmica com uma pressão negativa de 50 mbar por 5 s ($1\text{psi} = 6894.76 \text{ Pa}$). A detecção é UV em comprimento de

onda de 210 nm. A voltagem aplicada para esta separação foi de 30 KV, polaridade negativa. Os dados foram adquiridos e tratados pelo software HP Chemstation.

3.3 Preparação das amostras

3.3.1 Glicerina Livre

A extração da glicerina foi realizada adicionando-se 200 mg de amostra de biodiesel em um tubo de 1,2 mL (exatidão $\pm 0,1$ mg), 800 mg de água desionizada e 200 μ L de clorofórmio. O tubo foi agitado em vortex por 10 minutos e centrifugado a 2000 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação foram transferidos exatamente 300 μ L da fase aquosa para um frasco e adicionados 300 μ L da solução de periodato de sódio contendo o nitrato de sódio como padrão interno (9:1, v/v). A amostra assim preparada é injetada no equipamento de EC. As soluções padrão de glicerol foram preparadas da mesma maneira.

3.3.2 Glicerina Total

Foram pesados cerca de 100 mg de biodiesel em um tubo de ensaio com tampa e adicionado 1 mL de uma mistura de etanol (95%) contendo 5% de KOH. A mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 1 mL de uma mistura clorofórmio/HOAc (90:25, v/v) e 5 mL de água desionizada. A mistura foi agitada levemente e deixada em repouso por 5 minutos para a separação das fases. A fase aquosa foi diluída 1:1 (v/v) com água desionizada para a determinação de glicerina total em amostras de biodiesel. Em seguida 300 μ L da fase aquosa foram transferidos para um frasco e adicionados 300 μ L da solução de periodato de sódio contendo o nitrato de sódio como padrão interno (9:1, v/v). A amostra foi injetada no equipamento de EC.

3.3.3 Preparação da amostra de biodiesel para estudo de recuperação

O éster metílico foi preparado a partir do óleo de soja utilizando álcool metílico anidro e hidróxido de potássio como catalisador seguindo o procedimento geral segundo Freedman⁵². O procedimento utilizado foi o seguinte: 0,60 g de KOH dissolvido em 24,7 mL de metanol e adicionado em 103 g de óleo de soja na temperatura de 65 °C, agitado magneticamente e mantido na temperatura por

2,5 horas. Depois de resfriada a parte superior foi retirada e neutralizada com ácido acético, lavada com água a 70 °C para retirar os resíduos de glicerina livre e em seguida aquecida em vácuo para extração de partes de álcool metílico e água. A amostra foi filtrada em uma coluna de amido com o objetivo de eliminar traços de glicerina, e glicerídeos ainda presentes⁵³.

3.3.4 Estudo da Recuperação da Glicerina Livre

Inicialmente a glicerina é dissolvida em acetona por ser um meio solúvel também em biodiesel, foram adicionadas concentrações de glicerina em biodiesel em três níveis 80, 150 e 230 mg.Kg⁻¹. Estas amostras foram preparadas em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do método

Utilizando-se os valores de pKa e μ_{abs} para os analitos de interesse foram construídas as curvas de mobilidade efetiva utilizando-se a Equação 3 (Figura 12).

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_{abs} \alpha_j) \quad (3)$$

onde α_j é a fração molar e μ_{abs} é a mobilidade absoluta de cada espécie.

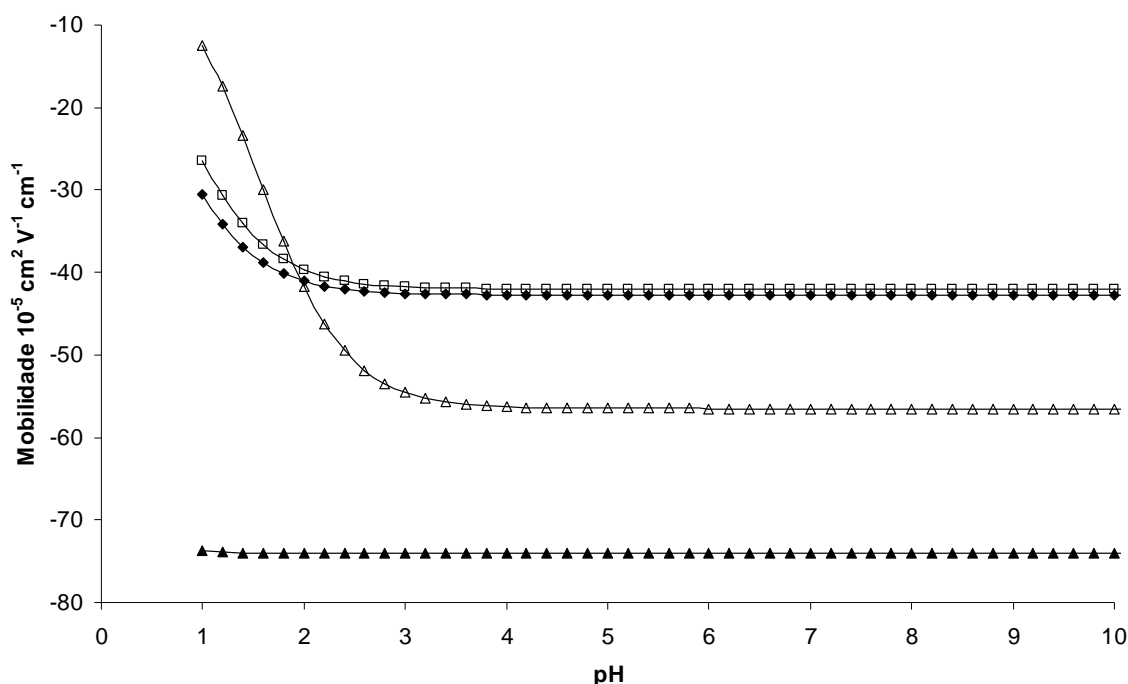


Figura 12: Curvas de mobilidade efetiva vs. pH dos analitos de interesse.
 Legenda: (▲nitrato; △ periodato; □ iodato; ◆ trifluoroacetato).

Os valores de pK_a e μ_{abs} foram obtidos por Hirokawa *et al.*⁵⁴.

A determinação do nitrato como padrão interno e do TFA como co-íon foi feita com base em suas mobilidades efetivas em pH maior que 2,2 através de rotina escrita em Visual Basic (software Excel) a qual utiliza o banco de dados de mobilidade absoluta e pK_a obtidos por Hirokawa *et al.*⁵⁴. Esta rotina tem como dados de entrada uma faixa de mobilidade efetiva requerida num dado valor de pH, a partir destes dados são calculadas as mobilidades efetivas utilizando-se a Equação 3 para todos os compostos presentes no banco de dados, sendo os dados de saída os compostos que possuem a mobilidade efetiva requerida no pH selecionado. A utilização das curvas de mobilidade efetiva calculadas pela Equação 3 sem um termo para correção de força iônica serve apenas como guia para a escolha dos componentes do eletrólito de corrida e o pH de separação, aplicável principalmente para espécies totalmente ionizadas que apresentem carga elétrica igual a 1.

É possível observar na Figura 11 que em valores de pH maior que 2,2 haverá a separação das bandas do nitrato, periodato e iodato, sendo que o iodato apresenta mobilidade próxima à do TFA. Na faixa de pH de 2,2 a 3 a análise pode ser realizada no modo contra eletrosmótico sem um aumento significativo

do tempo de análise, pois a mobilidade do fluxo eletrosmótico é negligenciável em relação à mobilidade dos analitos. Neste modo de operação espera-se reduzir a presença de possíveis interferentes, uma vez que apenas espécies com alta mobilidade em pH baixo são detectadas num curto tempo de análise.

A fim de verificar os valores de dispersão por eletromigração (EMD) e a formação de picos de sistema, foi utilizado o software Peakmaster[®] ^{55,56,57}. Os fenômenos de EMD para eletrólitos fortes podem ser descritos por modelos que se baseiam principalmente na diferença de mobilidade efetiva entre o analito e seu co-íon no eletrólito de corrida ⁵⁸. Os fenômenos de EMD para eletrólitos fracos são descritos pela chamada velocidade de slope, S_x ⁵⁹.

No eletrólito de corrida otimizado não devem ocorrer picos de sistema próximos ou coincidentes com os picos da amostra, pois esse fenômeno pode ser prejudicial à separação ⁶⁰.

O contra-íon escolhido foi a glicina. A escolha foi feita com base no pKa (2,32) deste composto, a fim de que se tenha uma boa capacidade tamponante. Na Figura 13, construída utilizando-se o software Peakmaster[®], são apresentadas as curvas de mobilidade efetiva, EMD, capacidade tamponante e condutividade para um eletrólito de corrida constituído de um valor constante de 20 mmol L⁻¹ de glicina e valores variáveis de 2 – 20 mmol L⁻¹ de TFA que geram valores diferente de pH.

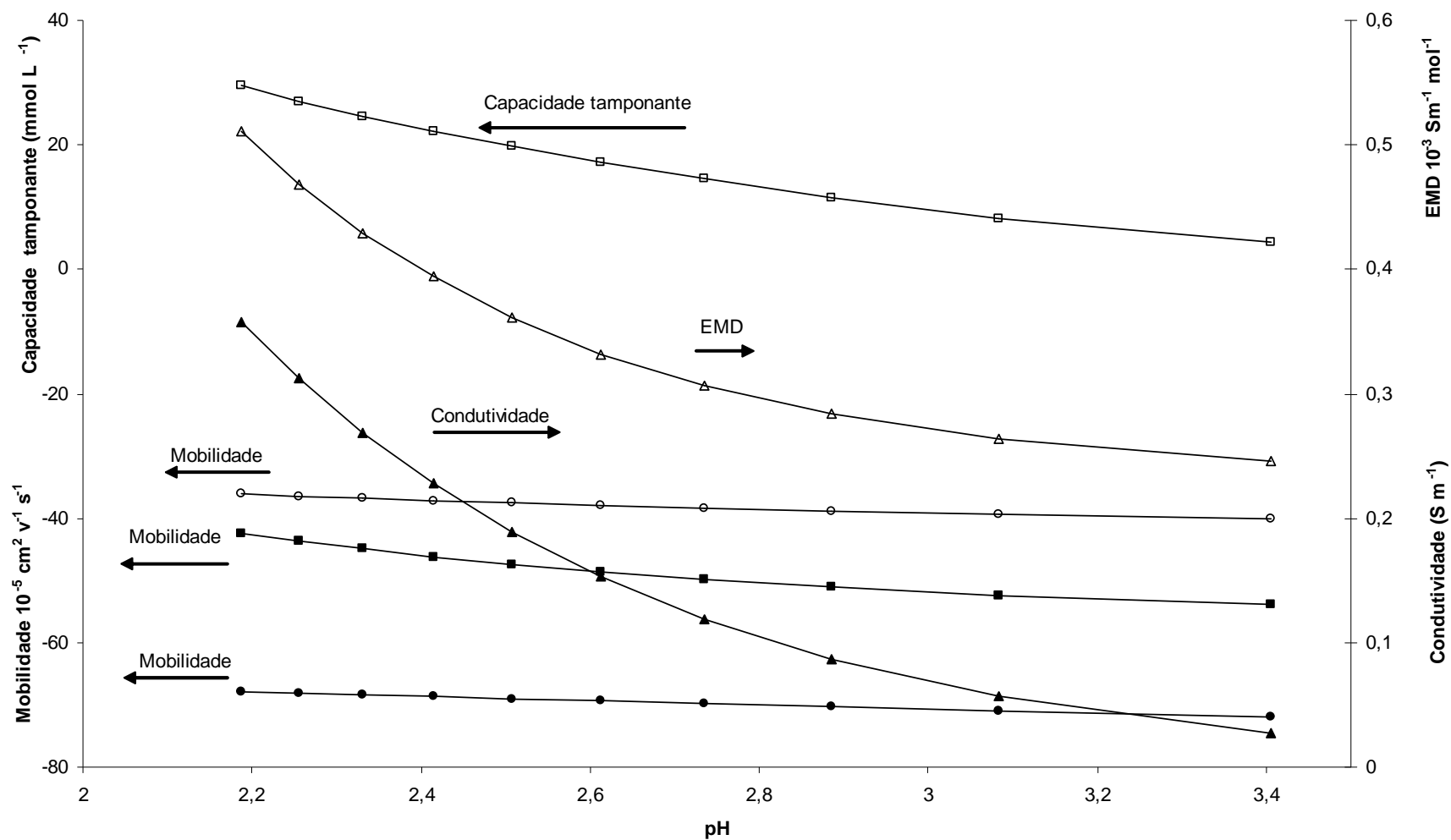


Figura 13: Curvas construídas utilizando o software Peakmaster®. Condição: concentração constante de glicina 20 mmolL⁻¹, TFA variando de 2 - 20 mmolL⁻¹ o que gera o pH mostrado na Figura. Legenda: (● nitrato; ■ periodato; ○ iodato; □ Capacidade tamponante; △ EMD Iodato; ▲ condutividade). As setas indicam o eixo y para cada parâmetro.

A partir da Figura 13 determinou-se o pH 2,6, onde as concentrações de glicina e TFA são 20 mmol L⁻¹, e 10 mmol L⁻¹ respectivamente como condição satisfatória de separação. Nesta condição haverá a separação dos analitos, pois as diferenças de mobilidade efetiva são suficientes. Em valores de pH acima de 2,6 a EMD para o iodato diminui, porém a capacidade tamponante diminui e o fluxo eletrosmótico aumenta o que implica em um aumento do tempo de análise quando se trata de uma análise no modo contra eletrosmótico, em que a mobilidade efetiva dos analitos é maior que a mobilidade do fluxo eletrosmótico. Em valores de pH menores que 2,6 a capacidade tamponante aumenta, porém ocorre um aumento da EMD para o iodato e a condutividade aumenta, ocasionando valores maiores de corrente elétrica

4.2. Aumento da velocidade de separação

Dentre os requisitos necessários para a obtenção de métodos rápidos em eletroforese capilar é importante que se utilize um elevado valor de campo elétrico, a amostra seja injetada pela extremidade do capilar mais próxima do detector e o capilar tenha um comprimento pequeno.

Para que seja possível a utilização de altos valores de campo elétrico, a corrente elétrica resultante não pode ser elevada, de modo a minimizar o efeito Joule. A injeção pela extremidade do capilar mais próxima do detector poderá ser utilizada quando a resolução entre os analitos for suficiente ⁶¹.

4.3 Discussão

Na Figura 14A é apresentado o eletroferograma simulado para esta separação, na Figura 14B um eletroferograma experimental dos padrões e na Figura 14C um eletroferograma de uma amostra de biodiesel preparada segundo método apresentado na seção 3.3.1. A mobilidade do fluxo eletrosmótico utilizada na simulação foi obtida experimentalmente.

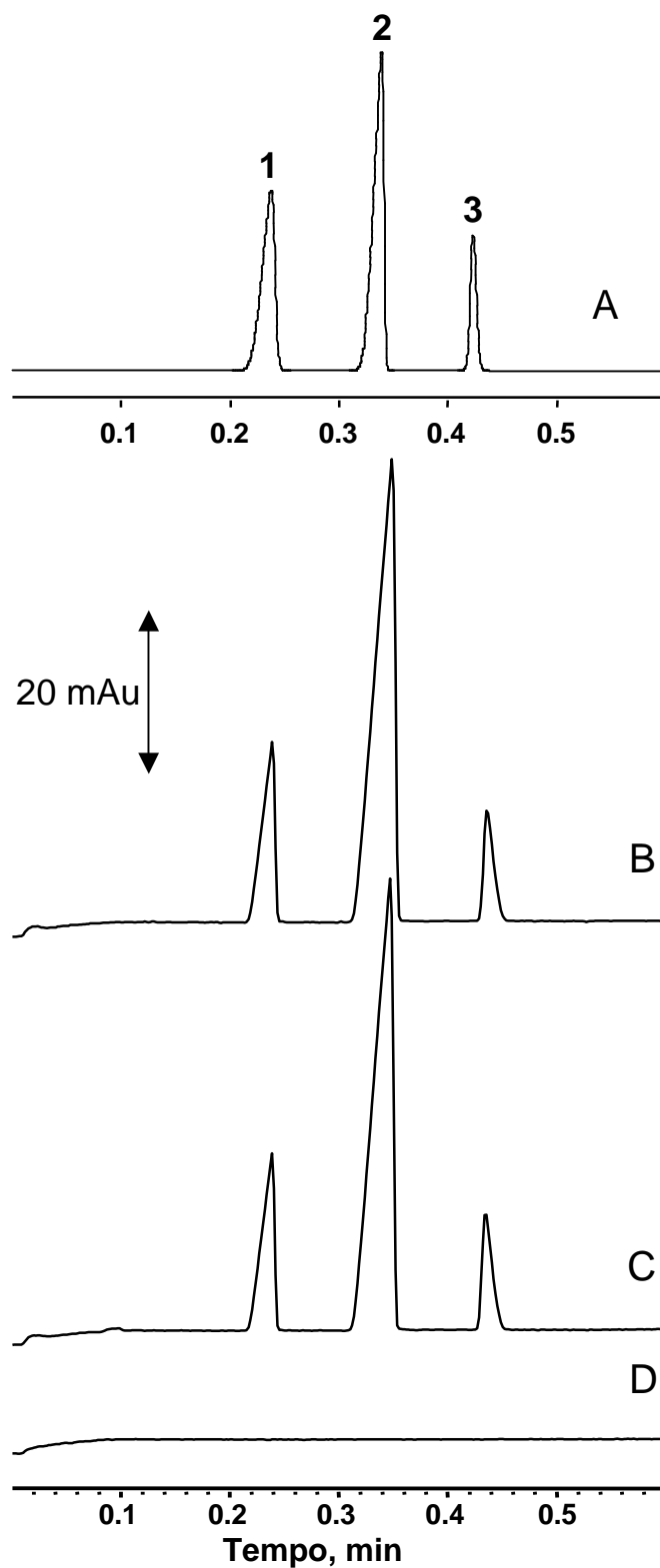


Figura 14: Simulação Peakmaster®, Fluxo eletrosmótico obtido experimentalmente (A), Eletroferogramas de padrões (B) amostra (C) e (D) amostra sem adição de periodato e nitrato (seletividade). Eletrólito composto por 20 mmol L⁻¹ glicina, 10 mmol L⁻¹ TFA (pH 2,6). Condições: injeção hidrodinâmica (-50 mbar, 5 s), tensão aplicada 30 kV; 25 °C; detecção direta em 210 nm. 1) nitrato; 2) periodato; 3) iodato.

A partir da comparação entre as Figuras (14 A, B e C) podemos observar que a simulação e os dados experimentais são bastante próximos. Também é importante ressaltar a boa simetria do pico do iodato, o que está de acordo com os dados apresentados na Figura 12 (EMD). Além disso, é interessante notar também que no eletroferograma simulado e experimental não foram detectados picos de sistema próximos à região dos analitos. O tempo de análise obtido foi apreciavelmente curto, sendo menor que 28 s devido à utilização de um valor elevado de campo elétrico (937,5 V/cm) e a injeção pela extremidade do capilar mais próxima do detector (comprimento efetivo 8,5 cm).

4.3.1 Reação entre glicerina e periodato

Na Figura 15 são apresentados os dados da medida de formação do iodato a partir da reação entre a glicerina e o periodato segundo a reação apresentada na Figura 3. É possível observar que a reação se completa em menos de dois minutos. O iodato formado foi estável por várias horas uma vez que as replicatas de injeção da mesma amostra foram feitas em intervalos de mais de duas horas e não apresentaram variação significativa de área corrigida.

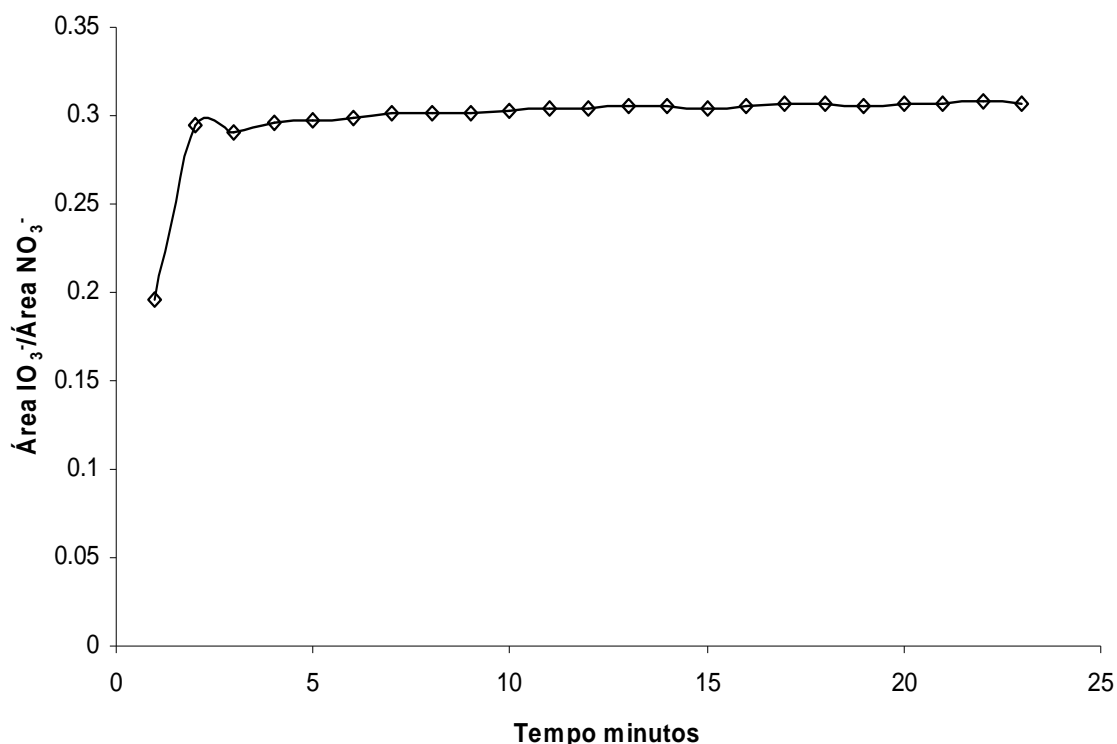


Figura 15: Estudo do tempo de estabilidade do iodato formado após a oxidação da glicerina pelo periodato.

4.4 Figuras de Mérito de Validação

Com o propósito de validar a metodologia proposta para a determinação de glicerina livre e total em amostras de biodiesel os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: seletividade, precisão (intra e inter-ensaio), linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

A Figura 13D mostra o eletroferograma de uma amostra preparada segundo o procedimento descrito no item 3.3.1 sem a adição da mistura de padrão interno e periodato, indicando que nenhum interferente foi detectado.

A repetibilidade (intra e inter-ensaio) foi estabelecida por 20 injeções consecutivas de uma mistura de padrão de glicerina, periodato e padrão interno. A repetibilidade do tempo de migração e a área do pico corrigida foram melhores que 0,45 e 1,1% CV respectivamente. (Tabela 2)

A precisão intermediária (precisão inter-ensaio) foi estabelecida por 9 injeções consecutivas de uma mistura de padrão de glicerina, periodato e de padrão interno em três dias diferentes. A repetibilidade do tempo de migração e a área corrigida do pico eram melhores que 0,8 e 1,7% respectivamente. (Tabela 2). Outra medida de precisão inter-ensaio foi realizada através de diferentes curvas de calibração construídas em três diferentes meses. Cada uma das curvas de calibração foi construída em um capilar diferente com 9 níveis de concentração (variando de 12 e 82 mg L⁻¹), todas as concentrações foram preparadas em duplicata e injetadas em triplicata. Misturas de padrões de concentração conhecida (12,5, 20,5 e 30,7 mg L⁻¹ de glicerina) foram preparadas segundo procedimento apresentado no item 3.3.1 no terceiro mês e quantificadas utilizando-se as três curvas de calibração, a precisão variou 98,1 – 102,7 %.

Os valores dos coeficientes de correlação foram maiores que 0,9991 indicando que o método é linear (Tabela 2).

Os limites de detecção e quantificação apresentados na Tabela 3 foram calculados com base na relação sinal do ruído (S/R=3, S/R=10, respectivamente).

Tabela 2: Parâmetros de validação do método.

Precisão Intra-ensaio (n=20; CV%)			
Tempo de Migração	0,45		
Razão da área do pico pelo padrão interno	1,1		
Precisão Inter-ensaio (3 dias, n=9; CV%)			
Razão da área do pico pelo padrão interno	1,7		
Linearidade da curva de calibração			
12- 82 mg . L^{-1a} (n=9)			
Capilar	1	2	3
Coeficiente angular	0,0132	0,0128	0,013
Coeficiente linear	0,0197	0,025	0,0174
r ²	0,9996	0,9998	0,9991
Limite de detecção^b			
Glicerina livre (mg kg ⁻¹) (n=3)	4,3 ± 0,8		
Glicerina total (%) massa; (n=3)	0,007 ± 0,001		
Limite de quantificação^c			
Glicerina livre (mg kg ⁻¹) (n=3)	14,3 ± 1,0		
Glicerina total (%) massa; (n=3)	0,022 ± 0,002		

^a Cada amostra preparada em duplicata e injetada em triplicata^b S/R=3^c S/R=10

O teste de recuperação para a determinação do teor de glicerina livre utilizado como medida de exatidão é apresentado na Tabela 3. As amostras adicionadas segundo procedimento apresentado no item 3.3.4 e determinadas segundo o método apresentado neste trabalho variaram de 95,4 a 102,4 %, o que demonstra uma boa exatidão do método. A exatidão para a determinação do teor de glicerina total foi avaliada em comparação ao método ASTM D 6584, e os valores obtidos pelo referido método e pelo método apresentado neste trabalho mostraram uma boa correlação, Tabela 3.

Tabela 3: Recuperação.

Glicerina Livre (mg kg⁻¹)		
Adicionado	Encontrado	Recuperado (%)^a
0	< LQ	-
80,3	81,2	101,1 ± 1.4
82,3	80,7	98,0 ± 1.8
129,5	132,6	102,4 ± 1.0
133,4	130,5	97,8 ± 2.4
178,8	177,3	99,2 ± 1.5
188,2	179,6	95,4 ± 1.8
Glicerina Total		
(%) em massa		
Amostra	Estudo atual	ASTM D 6584^b
Óleo de soja B	0,37 ± 0,03	0,4

^a Amostra preparada em duplicata e injetada em triplicata; ^b Valor declarado pelo fabricante

4.5 Análise das amostras

As análises das amostras comerciais para glicerina livre e total são apresentadas na Tabela 4. A preparação das amostras foi feita em duplicata e a injeção em triplicata. Segundo a regulamentação brasileira descrita pela norma ANP 42, todas as amostras apresentam valor menor que o especificado para glicerina livre (Tabela 4). A amostra de óleo de mamona apresenta um valor maior que o especificado para glicerina total (Tabela 4) indicando possivelmente falhas no processo de transesterificação.

Tabela 4: Análise glicerina livre e total em amostras de biodiesel.

Glicerina Total ^a	(%) massa
Óleo de mamona	1,64 ± 0,05
Gordura de aves	0.12 ± 0,02
Óleo de soja A	0.30 ± 0,03
Óleo de soja B	0.37 ± 0,03
Óleo de soja C	0.21 ± 0,01
Óleo de soja D	0.28 ± 0,03
Óleo de soja E	0.19 ± 0,03
Óleo de soja F	0.32 ± 0,01
Glicerina Livre ^a	(mg kg⁻¹)
Óleo de mamona	112,2 ± 0,7
Gordura de aves	< LQ
Óleo de soja A	50,7 ± 0,3
Óleo de soja B	61,9 ± 0,5
Óleo de soja C	< LQ
Óleo de soja D	< LQ
Óleo de soja E	190,9 ± 7,7
Óleo de soja F	< LQ

^a Amostras preparadas em duplicata e injetadas em triplicatas

5 CONCLUSÕES

Um método rápido, com uma boa exatidão e precisão para a extração e determinação de glicerina livre e total em amostras de biodiesel foi desenvolvido e validado utilizando eletroforese capilar. A otimização do eletrólito foi efetuada através da construção de curvas de mobilidade efetiva e utilização do software Peakmaster. O procedimento de otimização utilizado demonstrou ser uma poderosa ferramenta, uma vez que permitiu a obtenção do método apresentado com um número bastante reduzido de experimentos.

A reação do periodato com a glicerina mostrou-se rápida, eficiente e estável, demonstrando sua aplicabilidade.

O procedimento de calibração realizado indica que é possível utilizar a mesma curva de calibração durante um longo período, minimizando assim o número de medidas para uma dada determinação.

Os resultados de precisão intra e inter-ensaio, linearidade, especificidade e recuperação demonstraram que o método pode ser aplicado a análise de glicerina livre e total em amostras de biodiesel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KRAWCZYK, T. Biodiesel - Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. In: _____. Inform 7, 1996. p.801-829.
2. FREITAS, Carlos.; PENTEADO, Maurício. Biodiesel – Energia do Futuro. São Paulo: Letra Boreal, 2006.
3. National Biodiesel Board; In: Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos, 1998, Curitiba. **Anais**. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná; Secretaria do Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, 1998 p.42.
4. Efeito Estufa - Greenhouse Effect. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/efeito-estufa/co2/efeito-estufa-dioxido.htm>>. Acesso em 18 Nov. 2006.
5. SHEEHAM et al. An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24772.pdf>> Acesso em 18 Nov. 2006.
6. GRABOSKI, M.S. et al. The Effect of Biodiesel Composition on Engine Emissions from a DDC Series 60 Diesel Engine. Disponível em: <<http://asae.frymulti.com/abstract.asp?aid=6999&t=2>> Acesso em 18 Nov. 2006.
7. SCHARMER, Klaus; Biodiesel – Energy and Environmental Evaluation of Rapeseed-Oil-Methyl-Ester. Disponível em: <http://www.senternovem.nl/mmfiles/102548_tcm24-124276.pdf> Acesso em 18 Nov. 2006.
8. OLIVEIRA, L. B., COSTA, A. O.; Biodiesel – Uma Experiência de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <<http://www.resol.com.br/textos/Biodiesel%20-%20uma%20experi%C3%AAncia%20de%20desenvolvimento%20sustent%C3%A1vel.pdf>> Acesso em 18 Nov. 2006.
9. **USEPA**, Summary results from NBB/USEPA tier I. Health and environmental effects testing for biodiesel under the requirements for usepa registration of fuels and fuel additives, 1998.

-
10. COSTA NETO, P.R. et al. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Quím. Nova**, v. 23, n.4, p. 531-537, Ago 2000.
11. COSTA NETO, Pedro Ramos. Obtenção de ésteres alquílicos (Biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. 2002. 120f Tese (Doutorado em Química) – universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
12. MA, F., CLEMENTS, L.D., HANNA, M.A. The effect of catalyst, free fatty acids, and water on transesterification of beef tallow. **Trans ASAE**, v. 41, n. 5, p.1261-1264, 1998.
13. Biodiesel: Legislação. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petro/legis_biodiesel.asp> Acesso em 01 Dez. 2006.
14. KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059 - 1070, Jun 2005.
15. CLOTHIER, P.Q.E. et. al. How do Diesel – Fuel Ignition Improvers Work, **Chemical Society reviews**, v. 22, p. 101 – 108, 1993.
16. VAN GERPEN, Jon H. et. al., **Determining the Influence of Contaminants on Biodiesel Properties**. Iowa State University, 1996.
17. PLANK, C., LORBEER, E., Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 461-468. 1995.
18. BONDIOLI, P., BELLA, L. D., An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **Eur. J. Sc. Technol.**, v. 107, p. 153-157, 2005.
19. ARZAMENDI, G. et. al., Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography. **Chemical Engineering Journal**, v. 122, p. 31– 40, 2006.

-
20. Bailer, J., Hueber, K., Determination of saponifiable glycerol in biodiesel. **Fraenius J. Anal Chem.**, Heidelberg, v. 340, n. 3, p. 186. mar 1991.
21. PUMERA, M. et. al., Determination of cyclodextrin content using periodate oxidation by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 891, p. 201–206, 2000.
22. CHATTOPADHYAY, A., HAGE, D.S. Determination of the diol content of chromatographic supports by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 758, p. 255 – 261, 1997.
23. HEIGER, D. N., High Performance Capillary Electrophoresis, **Hewlett Packard Company**, n. 12, p. 5091-6199E, 1997.
24. Tiselius, Arne, **The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins**, 1930. Tese (Doutorado em Química)-Universidade de Uppsala, Suécia, 1930.
25. HJERTÉN, S., Free zone electrophoresis. **Chromatographic Reviews**. v. 9, p. 122 - 219, 1967.
26. MIKKERS, F. E. P., EVERAERTS, F. M.; VERHEGGEN, Th. P. E.M., High-performance zone electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v. 169, p. 11-20, 1979.
27. JORGENSEN, J. W., LUKACS, K. D., Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1298 - 1302, 1981.
28. SANTOS, M. R., TAVARES, M. F. M., RUBIM, J. C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. **Química Nova**, vol. 23, n. 5, p. 585-589, Out 2000.
29. TAVARES, M. F. M., MCGUFFIN, V. L.; Theoretical-Model of Electroosmotic Flow For Capillary Zone Electrophoresis **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 3687-3696, 1995.
30. PIATAK, M., et. al., Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. **Biotechniques**, v. 70 - 81, p. 14, 1993.

-
31. NORTHROP, D. M., MCCORD, B. R., BUTLER, J. M.; Forensic applications of capillary electrophoresis, **Journal of Capillary Electrophoresis**, v.1 p. 158, 1994.
32. GORDON, M. J, et. al., Protocol for Resolving Protein Mixtures in Capillary Zone Electrophoresis, **Analytical Chemistry**. v. 63, p. 69 - 72, 1991.
33. FRENZ, J., WU, S. L.; HANCOCK, W. S., Separation of Collagens by Capillary Zone Electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v. 480, p. 371 - 378, 1989.
- ³⁴ MICKE, Gustavo Amadeu. **Otimização e simulação em eletroforese capilar**, 2004, 301 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, USP, São Paulo, 2004.
35. ISSAQ, H.J., Capillary electrophoresis of natural products-II, **Electrophoresis**, v. 20, p. 3190-3202, 1999.
36. ISSAQ, H.J., Capillary electrophoresis of natural products, **Electrophoresis**, v. 18, p. 2438-2452.
37. TOMÁS-BARBERÁN, F.A., Capillary electrophoresis: a new technique in the analysis of plant secondary metabolites, **Phytochem. Anal.** v. 6, p. 177 – 192, 1995.
38. WALBROEHL, Y., JORGENSON, J. W., On-column UV absorption detector for open tubular capillary zone electrophoresis , **Journal of Chromatography A**, v. 315, p. 135 - 143, 1984.
39. ALBIN, M., et. al., Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis – Evaluation of Derivatizing Reagents and techniques. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 417 - 422, 1991.
40. LEE, T. T; YEUNG, E. S., Quantitative-Determination of Native Proteins in Individual Human Erythrocytes by Capillary Zone Electrophoresis With Laser-Induced Fluorescence Detection, **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 3045-3051, 1992.
41. MOSELEY, M. A., Determination of Bioactive Peptides using Capillary Zone Electrophoresis Mass-Spectrometry, **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 109 - 114, 1991.
42. ACKERMANS, M. T., EVERAERTS, F. M.; BECKERS, J. L., Determination of Absolute Mobilities, pK Values and Separation Numbers by Capillary Zone

electrophoresis: Effective Mobility as a Parameter for Screening. **Journal of Chromatography A**. v. 537, p. 407- 428, 1991.

43. HUANG, X. Et. al. End-Column Detection for Capillary Zone Electrophoresis, **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 189 - 192, 1991.

44. ALTRIA, K. D., et. al., A gamma-ray detector for capillary zone electrophoresis and its use in the analysis of some radiopharmaceuticals, **Electrophoresis**. v. 11, p. 732 - 734, 1990.

45. CHEN C. Y., MORRIS, M. D., On-line multichannel Raman spectroscopic detection system for capillary zone electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v. 540, p. 355 - 363, 1991.

46. FRAZIER, Richard A., AMES, Jennifer M., NURSTEN, Harry E. **Capillary Electrophoresis for food Analysis: Method Development**. Royal Society of Chemistry, 2000, 128p.

47. **SKOOG**, Douglas A.; WEST, Donald M; HOLLER, F. James. Analytical chemistry: an introduction. 6th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, c1994. 612p

48. BARD, Allen J., FAULKNER, Larry R.; **Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications**, John Wiley & Sons: New York, 1980.

49. GROSSMAN, P. D., COLBURN, J. C., Eds.; **Capillary Electrophoresis: Theory and Practice**, Academic Press; San Diego, 1992.

50. Agilente technologies – Capillary Electrophoresis Principles, Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Scripts/Generic.ASP?IPage=833&indcol=N&prodcol=Y>> Acessado em 01 nov 2006.

51. **SKOOG**, Douglas A; HOLLER, F. James, Timothy A .Nieman. Principles of instrumental analysis. 5. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, c1998. 849p.

52. FREEDMAN, B. Variables Affecting of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 61, n. 10, p.1638-1643, 1984.

-
53. YATES, R. A., CALDWELL, J. D. Regeneration of Oils Used for Deep Frying: A Comparison of Active Filter Aids, **J. Am. Oil Chem. Soc.** v.70, n. 5, 507 – 511; 1993.
54. Hirokawa, T., et. al. **Journal of Chromatography A**, v. 271, 1983.
55. GĀS. B., et. al., Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model, **Journal of Chromatography A**, v. 905, p. 269 - 279, 2001.
56. STEDRY, M. , JAROS, M., GĀS. B., Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes, **Journal of Chromatography A**, v. 960, p. 187 – 198, 2002.
57. STEDRY, M. , et. al., Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes **Electrophoresis**, v. 24, p. 536 - 547, 2003.
58. STEDRY, M., et. al., High reproducibility of large-gel two-dimensional electrophoresis **Electrophoresis**, v. 25, p. 3040 - 3047, 2004.
59. GEBAUER, P. , BOCĚK, P. , Predictiing Peak Symmetry in Capillary Zone Electrophoresis: The Concept of The Peak Shape diagram. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 1557 - 1563, 1997.
60. GĀS. B., KENNDLER, E., System zones in capillary zone electrophoresis, **Electrophoresis**, v. 25, p. 3901 - 3912, 2004.
61. BARTAK, P. , et. al, **Journal of Chromatography B**, v. 758, p. 323, 2001.

ANEXO I

RESOLUÇÃO ANP Nº 42, DE 24.11.2004 - DOU 9.12.2004 – RETIFICADA DOU 19.4.2005

O DIRETOR-GERAL da AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP, em exercício, no uso das atribuições que lhe foram conferidas pela Portaria ANP nº [139](#), de 14 de julho de 2004, com base nas disposições da Lei nº [9.478](#), de 06 de agosto de 1997 e na Resolução de Diretoria nº 499, de 18 de novembro de 2004 e

Considerando o interesse para o País em apresentar sucedâneos para o óleo diesel;

Considerando a Medida Provisória nº [214](#), de 13 de setembro de 2004, que define o biodiesel como um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil;

Considerando as diretrizes emanadas pelo Conselho Nacional de Política Energética - CNPE, quanto à produção e ao percentual de biodiesel na mistura óleo diesel/biodiesel a ser comercializado;

Considerando a necessidade de estabelecer as normas e especificações do novo combustível para proteger os consumidores; resolve:

Art. 1º. Fica estabelecida, através da presente Resolução, a especificação de biodiesel, consoante as disposições contidas no Regulamento Técnico nº 4/2004, parte integrante desta Resolução que poderá ser adicionado ao óleo diesel em proporção de 2% em volume, comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional.

Art. 2º. Para efeitos desta Resolução define-se:

I - biodiesel - B100 - combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2004, parte integrante desta Resolução;

II - mistura óleo diesel/biodiesel - B2 - combustível comercial composto de 98% em volume de óleo diesel, conforme especificação da ANP, e 2% em volume de biodiesel, que deverá atender à especificação prevista pela Portaria ANP nº [310](#) de 27 de dezembro de 2001 e suas alterações;

III - mistura autorizada óleo diesel/biodiesel - combustível composto de biodiesel e óleo diesel em proporção definida quando da autorização concedida para testes e uso experimental conforme previsto pela Portaria ANP nº [240](#), de 25 de agosto de 2003;

IV - Distribuidor de combustíveis líquidos - pessoa jurídica autorizada pela ANP para o exercício da atividade de distribuição de combustíveis líquidos derivados de petróleo, álcool combustível, biodiesel, mistura óleo diesel/biodiesel especificada ou autorizada pela ANP e outros combustíveis automotivos;

V - Batelada - quantidade segregada de produto que possa ser caracterizada por um "Certificado da Qualidade".

Art. 3º. O biodiesel só poderá ser comercializado pelos Produtores de biodiesel, Importadores e Exportadores de biodiesel, Distribuidores de combustíveis líquidos e Refinarias.

Parágrafo único. Somente os Distribuidores de combustíveis líquidos e as Refinarias, autorizados pela ANP poderão proceder a mistura óleo diesel/biodiesel - B2, contendo 98% em volume de óleo diesel, conforme a especificação da ANP, e 2% em volume de biodiesel, respectivamente, para efetivar sua comercialização.

Art. 4º. Os Produtores e Importadores de biodiesel deverão manter sob sua guarda, pelo prazo mínimo de 02 (dois) meses a contar da data da comercialização do produto, uma amostra-testemunha do produto comercializado, armazenado em embalagem cor âmbar de 1 (um) litro de capacidade, fechada com batoque e tampa inviolável, mantida em local refrigerado em torno de 4 C em local protegido de luminosidade e acompanhada de Certificado da Qualidade.

§ 1º O Certificado da Qualidade referente à batelada do produto deverá ser emitido antes da liberação do produto para comercialização, firmado pelo responsável técnico pelas análises laboratoriais efetivadas, com indicação legível de seu nome e número da inscrição no órgão de classe e indicação das matérias-primas utilizadas para obtenção do biodiesel. Após a emissão do Certificado da Qualidade, se o produto não for comercializado no prazo máximo 3 meses, deverá ser reanalisada a estabilidade à oxidação para comercialização.

§ 2º Durante o prazo assinalado no caput deste artigo a amostra-testemunha e o respectivo Certificado da Qualidade deverão ficar à disposição da ANP para qualquer verificação julgada necessária.

§ 3º Os Produtores de biodiesel deverão enviar à ANP para o e-mail: cerbiodiesel@anp.gov.br até 15 dias após o final de cada trimestre civil os resultados de uma análise completa (considerando todas as características e métodos da especificação) de uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre correspondente e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar um número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas no formato de planilha eletrônica, devendo conter:

- I - codificação ANP do produtor de biodiesel;
- II - trimestre e ano de referência dos dados certificados;
- III - codificação ANP da matéria-prima;
- III - quadro de resultados em conformidade com o modelo abaixo:

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	MÉTODO DE ENSAIO	RESULTADO
----------------	---------	------------------	-----------

onde:

Característica - item da especificação do produto

Método de ensaio - referência do método de ensaio utilizado para determinação laboratorial 2.1.

Métodos ABNT Resultado - valor encontrado na determinação laboratorial

Art. 5º. Os Produtores de biodiesel deverão enviar os dados de qualidade do produto comercializado à ANP conforme Resolução ANP nº 17, de 01 de setembro de 2004 ou legislação que venha substituí-la.

Art. 6º. A documentação fiscal referente às operações de comercialização e de transferência de biodiesel realizadas pelos Produtores e Importadores de biodiesel deverá ser acompanhada de cópia legível do respectivo Certificado da Qualidade, atestando que o produto comercializado atende à especificação estabelecida no Regulamento Técnico. No caso de cópia emitida eletronicamente, deverá estar indicado, na cópia, o nome e o número da inscrição no órgão de classe do responsável técnico pelas análises laboratoriais efetivadas.

Art. 7º. Para o uso automotivo só poderá ser comercializada mistura óleo diesel/biodiesel - B2, observado o estabelecido na Portaria ANP nº [310](#), de 27 de dezembro de 2001, e suas alterações.

Parágrafo único. Para a mistura autorizada óleo diesel/biodiesel deverá ser atendida a Portaria ANP nº 240, de 25 de agosto de 2003.

Art. 8º. A ANP poderá, a qualquer tempo e às suas expensas, submeter os Produtores e Importadores de biodiesel à auditoria de qualidade sobre os procedimentos e equipamentos de medição que tenham impacto sobre a qualidade e a confiabilidade dos serviços de que trata esta Resolução, bem como coletar amostra de biodiesel para análise em laboratórios contratados.

Art. 9º. É proibida a adição de corante ao biodiesel.

Art. 10. O não atendimento ao disposto nesta Resolução sujeita o infrator às penalidades previstas na Lei nº [9.847](#), de 26 de outubro de 1999, e no Decreto nº 2.953, de 28 de janeiro de 1999.

Art. 11. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação no Diário Oficial da União.

Art. 12. Ficam revogadas a Portaria ANP nº [255](#), de 15 de setembro de 2003, e as disposições em contrário.

ANEXO A

REGULAMENTO TÉCNICO Nº 4/2004

1. Objetivo

Este Regulamento Técnico aplica-se ao biodiesel - B100, de origem nacional ou importada a ser comercializado em território nacional adicionado na proporção de 2% em volume ao óleo diesel conforme a especificação em vigor.

2. Normas Aplicáveis

A determinação das características do biodiesel será feita mediante o emprego das normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais "American Society for Testing and Materials" (ASTM), da "International Organization for Standardization" (ISO) e do "Comité Européen de Normalisation" (CEN).

Os dados de incerteza, repetitividade e reprodutibilidade fornecidos nos métodos relacionados neste Regulamento devem ser usados somente como guia para aceitação das determinações em duplicata do ensaio e não devem ser considerados como tolerância aplicada aos limites especificados neste Regulamento.

A análise do produto deverá ser realizada em uma amostra representativa do mesmo obtida segundo métodos ABNT NBR 14883 - Petróleo e produtos de petróleo - Amostragem manual ou ASTM D 4057 - Prática para Amostragem de Petróleo e Produtos Líquidos de Petróleo (Practice for Manual Sampling of Petroleum and Petroleum Products) ou ISO 5555 (Animal and vegetable fats and oils - Sampling) .

As características constantes da Tabela de Especificação deverão ser determinadas de acordo com a publicação mais recente dos seguintes métodos de ensaio:

HAROLDO BORGES RODRIGUES LIMA

MÉTODO	TÍTULO
NBR 7148	Petróleo e produtos de petróleo - Determinação da massa específica, densidade relativa e API - Método do densímetro
NBR 14065	Destilados de petróleo e óleos viscosos - Determinação da massa específica e da densidade relativa pelo densímetro digital.
NBR 10441	Produtos de petróleo - Líquidos transparentes e opacos - Determinação da viscosidade cinemática e cálculo da viscosidade dinâmica
NBR 14598	Produtos de petróleo - Determinação do Ponto de Fulgor pelo aparelho de vaso fechado Pensky-Martens
NBR 9842	Produtos de petróleo - Determinação do teor de cinzas
NBR 14359	Produtos de petróleo - Determinação da corrosividade - método da lâmina de cobre
NBR 14747	Óleo Diesel - Determinação do ponto de entupimento de filtro a frio
NBR 14448	Produtos de petróleo - Determinação do índice de acidez pelo método de titulação potenciométrica

2.2. Métodos ASTM

MÉTODO	TÍTULO
ASTM D 1298	Massa Específica, Densidade Relativa e Grau API de Petróleo e Produtos Líquidos de Petróleo pelo Método do Hidrômetro Density, Relative Density (Specific Gravity) or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method
ASTM D 4052	Massa Específica e Densidade Relativa pelo Densímetro Digital Density and Relative Density of Liquids by Digital Density Meter
ASTM D 445	Viscosidade Cinemática de Líquidos Transparentes e Opacos Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and the Calculation of Dynamic Viscosity)
ASTM D 2709	Água e Sedimentos nos Combustíveis Destilados Médios por Centrifugação Water and Sediment in Middle Distillate Fuels by Centrifuge
ASTM D 93	Ponto de Fulgor pelo Vaso Fechado Pensky-Martens Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester

ASTM D 1160	Destilação de Produtos de Petróleo a Pressão Reduzida Distillation of Petroleum Products at Reduced Pressure
ASTM D 4530	Determinação de Resíduo de Carbono (Método Micro) Determination of Carbon Residue (Micro Method)
ASTM D 189	Resíduo de Carbono Conradson de Produtos de Petróleo Conradson Carbon Residue of Petroleum Products
ASTM D 874	Cinzas Sulfatadas de Óleos Lubrificantes e Aditivos Sulfated Ash from Lubricating Oils and Additives
ASTM D 4294	Enxofre em Produtos de Petróleo por Espectrometria de Fluorescência de Raios X-Energia Dispersiva Sulfur in Petroleum Products by Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectroscopy
ASTM D 5453	Enxofre Total em Hidrocarbonetos Líquidos, Combustíveis para Motor e Óleos por Fluorescência de Ultravioleta Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Motor Fuels and Oils by Ultraviolet Fluorescence
ASTM D 4951	Determinação de Elementos de Aditivos em Óleos Lubrificantes por Espectrometria de Emissão de Plasma Determination of Additive Elements in Lubricating Oils by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
ASTM D 130	Deteção da Corrosividade ao Cobre de Produtos de Petróleo pelo Teste de Lâmina de Cobre Detection of Copper Corrosion from Petroleum Products by the Copper Strip Tarnish Test
ASTM D 613	Número de Cetano de Óleo Diesel Cetane Number of Diesel Fuel Oil
ASTM D 6371	Ponto de Entupimento de Filtro a Frio de Óleo Diesel e Óleos de Aquecimento Cold Filter Plugging Point of Diesel and Heating Fuels
ASTM D 664	Índice de Acidez dos Produtos de Petróleo por Titulação Potenciométrica Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration
ASTM D 6584	Determinação da Glicerina Livre e Total em Biodiesel Metil Ésteres por Cromatografia Gasosa Determination of Free and Total Glycerine in Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography

2.3. Métodos ISO/EN

MÉTODO	TÍTULO
EN ISO 3104	Produtos de Petróleo - Líquidos opacos e transparentes - Determinação de viscosidade cinemática e cálculo de viscosidade dinâmica Petroleum Products - Transparent and opaque liquids - Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity
EN ISO 12937	Produtos de Petróleo - Determinação de água - Método de Titulação Karl Fischer Petroleum Products - Determination of water - Coulometric Karl Fischer Titration Method
EN ISO 12662	Produtos Líquidos de Petróleo - Determinação de contaminação em destilados médios Liquid Petroleum Products - Determination of contamination in middle distillates
ISO/CD 3679	Produtos de Petróleo - Determinação de ponto de fulgor - Equilíbrio de fases em vaso fechado Petroleum Products - Determination of flash point - Rapid equilibrium closed cup
EN 14103	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de teor de éster e ácido linolênico metil éster Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents

EN ISO 10370	Produtos de Petróleo - Determinação de Resíduo de Carbono (Método Micro) Petroleum Products - Determination of carbon residue - Micro Method
ISO 3987	Produtos de Petróleo - Óleos Lubrificantes e Aditivos - Determinação de Cinzas Sulfatadas Petroleum Products - Lubricating oils and additives - Determination of sulfated ash
EN ISO 14596	Produtos de Petróleo - Determinação de Enxofre - Espectrometria de Fluorescência de Raio X Petroleum Products - Determination of sulfur content - Wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry
EN 14108	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Sódio por Espectrometria de Absorção Atômica Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of sodium content by atomic absorption spectrometry
EN 14109	Gorduras e derivados de óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Potássio por Espectrometria de Absorção Atômica Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of potassium content by atomic absorption spectrometry
EN ISO 3679	Determinação do ponto de fulgor - Método do vaso fechado equilíbrio rápido Determination of flash point - Rapid equilibrium closed cup method
EN 14108	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Sódio por Espectrometria de Absorção Atômica Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of sodium content by atomic absorption spectrometry
EN 14109	Gorduras e derivados de óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de teor de Potássio por Espectrometria de Absorção Atômica Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of potassium content by atomic absorption spectrometry
EN 14538	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de teor de Ca e Mg por Espectrometria de Emissão de Plasma Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of Ca and Mg content by optical emission spectral analysis with inductively coupled plasma(ICP OES)
EN 14107	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Fósforo por Espectrometria de Emissão de Plasma Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of phosphorous content by inductively coupled plasma (ICP) emission spectrometry
EN ISO 2160	Produtos de Petróleo - Corrosividade ao Cobre - Teste de Lâmina de Cobre Petroleum Products - Corrosiveness to copper - Copper strip test
EN ISO 5165	Óleo Diesel - Determinação de Qualidade de Ignição - Método Cetano Diesel fuels - Determination of the ignition quality of diesel fuels - Cetane engine method
EN 14104	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação do Índice de Acidez Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of acid value
EN 14105	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Glicerina livre e mono-, di- e triglicerídeo - (Método de Referência) Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of free glycerol and mono-, di- and triglyceride content - (Reference Method)
EN 14106	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Glicerina Livre Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of free glycerol content
EN 14110	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Metanol Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of methanol content

EN 14111	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação de Índice de Iodo Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of iodine value
EN 14112	Gorduras e Derivados de Óleo - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Determinação da estabilidade à oxidação (teste de oxidação acelerada) Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)

Tabela I: Especificação do Biodiesel B100

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20°C	kg/m ³	Anotar (2)	7148, 14065	1298, 4052	- , -
Viscosidade Cinemática a 40 °C,	mm ² /s	Anotar (3)	10441	445	EN ISO 3104
Água e sedimentos, máx. (4)	% volume	0,050	-	2709	-
Contaminação Total (6)	mg/kg	Anotar	-	-	EN 12662
Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0	14598	93	-
			-	-	EN ISO3679
Teor de éster (6)	% massa	Anotar	-	-	EN 14103
Destilação; 90% vol. recuperados, máx.	°C	360 (5)	-	1160	-
Resíduo de carbono dos 100% destilados, máx.	% massa	0,10	-	4530, 189	EN ISO 10370, -
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	9842	874	ISO 3987
Enxofre total (6)	% massa	Anotar	-	4294	-
			-	5453	EN ISO 14596
			-	-	-
Sódio + Potássio, máx	mg/kg	10	-	-	EN 14108
			-	-	EN 14109
Cálcio + Magnésio (6)	mg/kg	Anotar	-	-	EN 14538
Fósforo (6)	mg/kg	Anotar	-	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de Cetano (6)	-	Anotar	-	613	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(7)	14747	6371	-
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,80	14448	664	-
			-	-	EN 14104 (8)
Glicerina livre, máx.	% massa	0,02	-	6584 (8) (9)	-
			-	-	EN 14105 (8) (9)
			-	-	EN 14106 (8) (9)
Glicerina total, máx.	% massa	0,38	-	6584 (8) (9)	-
			-	-	EN 14105 (8) (9)
Monoglicerídeos (6) .	% massa	Anotar	-	6584 (8) (9)	-
			-	-	EN 14105 (8) (9)

Diglicerídeos (6)	% massa	Anotar	-	6584 (8) (9)	-
			-	-	EN 14105 (8) (9)
Triglicerídeos (6)	% massa	Anotar	-	6584 (8) (9)	-
			-	-	EN 14105 (8) (9)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,5	-	-	EN 14110 (8)
Índice de Iodo (6)		Anotar	-	-	EN 14111 (8)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín	h	6	-	-	EN 14112 (8)

Nota:

(1) LII – Límpido e isento de impurezas.

(2) A mistura óleo diesel/biodiesel utilizada deverá obedecer aos limites estabelecidos para massa específica a 20°C constantes da especificação vigente da ANP de óleo diesel automotivo.

(3) A mistura óleo diesel/biodiesel utilizada deverá obedecer aos limites estabelecidos para viscosidade a 40°C constantes da especificação vigente da ANP de óleo diesel automotivo.

(4) O método EN ISO12937 poderá ser utilizado para quantificar a água não dispensando a análise e registro do valor obtido para água e sedimentos pelo método ASTM D 2709 no Certificado da Qualidade.

(5) Temperatura equivalente na pressão atmosférica.

(6) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados pelo produtor de biodiesel à ANP, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.

(7) A mistura óleo diesel/biodiesel utilizada deverá obedecer aos limites estabelecidos para ponto de entupimento de filtro a frio constantes da especificação vigente da ANP de óleo diesel automotivo.

(8) Os métodos referenciados demandam validação para as oleaginosas nacionais e rota de produção etílica.

(9) Não aplicáveis para as análises mono-, di-, triglicerídeos, glicerina livre e glicerina total de palmiste e coco. No caso de biodiesel oriundo de mamona deverão ser utilizados, enquanto não padronizada norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT para esta determinação, os métodos: do Centro de Pesquisas da Petrobrás - CENPES constantes do ANEXO B para glicerina livre e total, mono e diglicerídeos, triglicerídeos.